

Российская академия наук

РОССИЙСКИЙ ИММУНОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

Russian Journal of Immunology

Том 13 (22), №2

2019

Апрель – Июнь

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

**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

ОБЪЕДИНЁННЫЙ ИММУНОЛОГИЧЕСКИЙ ФОРУМ – 2019

Новосибирск, 24–29 июня 2019 года

- VI Съезд Российского научного иммунологического общества (РНОИ)
- VIII Конференция Российского цитокинового общества (РЦО)
- VIII Конференция по иммунологии репродукции
- VIII Конференция по нейроиммунологии
- XV Конференция иммунологов Урала
- Конференция по таргетной и клеточной иммунотерапии
- Конференция по онкогематологии и онкоиммунологии
- Международная конференция по первичным иммунодефицитам
- Школа по проточной цитометрии
- Школа по ревматологии
- Циклы повышения квалификации

ОРГАНИЗАТОРЫ ФОРУМА

Министерство здравоохранения РФ

Российская академия наук

Российский фонд фундаментальных исследований (РФФИ)

НИИ фундаментальной и клинической иммунологии (НИИФКИ)

Новосибирский государственный медицинский университет (НГМУ)

Новосибирский государственный университет (НГУ)

Институт иммунологии и физиологии УрО РАН

ГНЦ – Институт иммунологии ФМБА РФ

НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера

Институт особо чистых биопрепаратов ФМБА РФ

НМИЦ Детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Д. Рогачева

НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова

Санкт-Петербургский государственный университет

Российское научное общество иммунологов (РНОИ)

Российское цитокиновое общество (РЦО)

Российская ассоциация аллергологов и клинических иммунологов (РААКИ)

Национальная ассоциация экспертов в области первичных иммунодефицитов (НАЭПИД)

Научное общество по нейроиммунологии и нейроиммуномодуляции

Союз аллергологов и иммунологов СНГ

Общество ревматологов России

Инициативная группа по созданию Российского общества иммунологии репродукции

Международный просветительский проект по первичным иммунодефицитам J Project

Уральское общество иммунологов, аллергологов и реабилитологов

Мероприятие проведено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, проект № 19-015-20003

СОСТАВ НАУЧНО-ОРГАНИЗАЦИОННОГО КОМИТЕТА

Председатель Форума:

В. А. Черешнев Президент РНОИ – академик РАН (Екатеринбург)

Сопредседатели:

В. А. Козлов Председатель РЦО – академик РАН (Новосибирск)

Р. М. Хаитов Председатель РААКИ – академик РАН (Москва)

Р. И. Сепиашвили Председатель САИ-СНГ – член-корр. РАН

А. Г. Румянцев Председатель НАЭПИД – академик РАН (Москва)

Laszlo Marodi Руководитель J Project – профессор (Венгрия)

Координатор научной программы:

И. Г. Козлов Вице-президент РНОИ – профессор (Москва)

Члены научно-организационного комитета:

А.Г. Борисов	– к.м.н. (Красноярск)	Д.В. Пышный	– член-корреспондент РАН (Новосибирск)
Т.П. Ветлугина	– д.б.н., профессор (Томск)	М.Б. Раев	– д.б.н., профессор (Пермь)
Е.Д. Гаврилова	– к.б.н. (Новосибирск)	А.П. Ризопулу	– д.б.н. (Москва)
Л.В. Ганковская	– д.м.н., профессор (Москва)	О.А. Свитич	– член-корреспондент РАН (Москва)
А.Г. Гончаров	– к.м.н. (Калининград)	С.В. Сенников	– д.м.н., профессор (Новосибирск)
А.Н. Глушков	– д.м.н., профессор (Кемерово)	А.Н. Силков	– д.б.н. (Новосибирск)
И.И. Долгушин	– академик РАН (Челябинск)	А.С. Симбирцев	– член-корреспондент РАН (Санкт-Петербург)
А.В. Жестков	– д.м.н., профессор (Самара)	С.В. Смирнова	– д.м.н., профессор (Красноярск)
С.А. Заморина	– д.б.н. (Пермь)	Н.Ю. Сотникова	– д.м.н., профессор (Иваново)
А.В. Зурочка	– д.м.н., профессор (Челябинск)	Ю.Г. Суховой	– д.м.н., профессор (Тюмень)
Н.И. Ильина	– д.м.н., профессор (Москва)	Л.Ф. Телешева	– д.м.н., профессор (Челябинск)
А.В. Караулов	– академик РАН (Москва)	А.А. Тотолян	– академик РАН (Санкт-Петербург)
Л.И. Колесникова	– академик РАН (Иркутск)	И.А. Тузанкина	– д.м.н., профессор (Екатеринбург)
Н.В. Колесникова	– д.б.н., профессор (Краснодар)	А.В. Тутельян	– член-корреспондент РАН (Москва)
Н.А. Колчанов	– академик РАН (Новосибирск)	Ф.П. Федорук	– член-корреспондент РАН (Новосибирск)
В.И. Коненков	– академик РАН (Новосибирск)	Т.Г. Федоскова	– д.м.н., профессор (Москва)
Е.А. Корнева	– академик РАН (Санкт-Петербург)	М.Р. Хаитов	– член-корреспондент РАН (Москва)
В.А. Краснов	– д.м.н., профессор, заслуженный врач РФ (Новосибирск)	С.В. Хайдуков	– д.б.н. (Москва)
Л.С. Литвинова	– д.б.н. (Калининград)	К.В. Хальзов	– к.м.н. (Новосибирск)
Ю.В. Лобзин	– академик РАН (Санкт-Петербург)	Н.А. Хонина	– д.м.н., профессор (Новосибирск)
И.О. Маринкин	– д.м.н., профессор (Новосибирск)	Н.В. Чердынцева	– член-корреспондент РАН (Томск)
Е.В. Маркелова	– д.м.н., профессор (Владивосток)	Е.Р. Черных	– член-корреспондент РАН (Новосибирск)
Е.В. Маркова	– д.м.н., профессор (Новосибирск)	Е.Я. Шевела	– д.м.н. (Новосибирск)
В.А. Мордвинов	– д.м.н., профессор (Новосибирск)	В.С. Ширинский	– д.м.н., профессор (Новосибирск)
Е.Л. Насонов	– академик РАН (Москва)	И.В. Ширинский	– д.м.н. (Новосибирск)
И.В. Нестерова	– д.м.н., профессор (Краснодар)	К.В. Шмагель	– д.м.н., профессор (Пермь)
А.А. Останин	– д.м.н., профессор (Новосибирск)	А.Ю. Щербина	– д.м.н., профессор РАН (Москва)
А.П. Продеус	– д.м.н., профессор (Москва)		
А.Г. Покровский	– член-корреспондент РАН (Новосибирск)		

Технический комитет форума

к.б.н. Л.В. Гришина (Новосибирск), Н.Б. Кирилова (Новосибирск),
Н.В. Ракитянская (Санкт-Петербург), к.м.н. М.А. Болков (Екатеринбург)

Техническое сопровождение Форума

Общество с ограниченной ответственностью «БизнесСтандарт»
Адрес: 630099, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, д. 68/1, оф. 403
Сайт bs-sib.ru

ФОРУМ ОРГАНИЗОВАН ПРИ ПОДДЕРЖКЕ

Генеральный спонсор

ООО «Бекмен Культер»

Спонсоры

Штада, НПО Петровакс Фарм, АО Пептек, CSL BEHRING, ЛЕО Фармасьютикал, Новартис Фарма,
Корус Фарма, Мерк-Люминекс, MIRUS Medical, Ферон, Хеликон, Мединторг, Биокоммерс,
Фирн М, Лабтех, Аналитика, Инвитро, Бiotек, КДЛ Новосибирск-тест

СОДЕРЖАНИЕ

Том 13 (22), № 2, 2019

Оригинальные статьи

- Т. В. Абакумова, Т. П. Генинг, Д. Р. Долгова, И. И. Антонеева, С. О. Генинг*
Влияние уровня провоспалительных цитокинов на образование внеклеточных нейтрофильных ловушек при распространенном раке яичников 704
- А. А. Альшевская, И. А. Беломестнова, Ю. В. Жукова, О. А. Чумасова, Н. С. Шкаруба, А. Э. Сизиков, Ю. А. Сенникова, О. П. Воробьева*
Ко-экспрессия рецепторов к фактору некроза опухоли альфа в субпопуляциях Т-клеток при ревматоидном артрите 707
- А. Ю. Артамонов, М. С. Сухарева, П. М. Копейкин, А. Н. Сухачев, Т. А. Филатенкова, Д. С. Орлов, О. В. Шамова*
Эффекты пролин-богатых пептидов на функциональную активность лейкоцитов человека *in vitro* 710
- К. М. Ачасова, Е. А. Литвинова*
Мыши с нокаутом гена *Muc2* – модель для оценки способов воздействия на микрофлору кишечника 713
- А. В. Батенева, С. Г. Гамалей, Л. Р. Лебедев, Е. Д. Даниленко*
Активация транскрипции генов системы интерферона под влиянием дрожжевой двуспиральной РНК 716
- Е. Л. Болховитина, А. С. Федорина, А. О. Богородский, А. О. Смирнова, Е. Н. Чурсанова, А. М. Сапожников, В. И. Борщевский, М. А. Шевченко*
Исследование феномена миграции нейтрофилов в лимфатические сосуды в процессе воспаления, индуцированного условно-патогенным грибом *A. Fumigatus* 719
- Т. Ю. Бондаренко, В. А. Святченко, В. А. Терновой*
Анализ уровня экспрессии гена человека TIM-1 методом количественной ПЦР в реальном времени 722
- Ю. В. Валиева, Е. М. Куклина*
Экспрессия плексина V1 Т-лимфоцитами человека: роль в контроле активации клеток 725
- А. А. Василишина, А. В. Демьянов, В. С. Монахова, А. В. Жахов, А. В. Трофимов, Е. С. Денисенко, К. А. Некрасова, С. В. Родин, А. С. Симбирцев, А. М. Ищенко*
Получение и характеристика рекомбинантного антитела к C5a анафилотоксину компонента 728
- А. О. Власова*
Уровень цитокинов в сыворотке крови у пациентов с приобретенным ангиоотеком 731
- Н. В. Воробьева, В. В. Кулаков*
Роль белка DRP1, ответственного за фрагментацию митохондрий, в окислительном взрыве и НЕТозе нейтрофилов человека 733
- Е. В. Гаврилюк, А. И. Конопля, В. П. Михин, Ю. В. Прокофьева, Л. Н. Серикова*
Иммунные нарушения и артериальное давление у пациентов с артериальной гипертонией 736
- О. Н. Гейн, Т. В. Гаврилова, Я. А. Кадочникова, М. В. Черешнева, В. А. Черешнев*
Иммуномодулирующие эффекты миелопептидов МП-5 и МП-6 при стрессе 739
- С. В. Гейн*
Регуляция β-эндорфином и динорфином А секреторной активности клеток перитонеальной полости мышей при стрессе 742

<i>О. А. Гизингер, А. М. Коркмазов, М. Ю. Коркмазов, В. И. Карандашов, Е. С. Завгородний</i>	
Монохроматический некогерентный свет оптического диапазона 450 нм влияет на содержание цитокинов в назальных смывах у ринохирургических больных	745
<i>Е. В. Гладкова</i>	
Особенности иммунных механизмов регуляции ремоделирования хрящевой и костной тканей при ранних и поздних проявлениях первичного и посттравматического остеоартроза	748
<i>Н. С. Глебездина, И. В. Некрасова, А. А. Олина, Г. К. Садыкова</i>	
Вклад разных типов мелатониновых рецепторов в гормон-зависимую регуляцию дифференцировки Т-лимфоцитов, продуцирующих IL-17 (Th17)	751
<i>Н. П. Горбунов, А. В. Жахов, А. В. Трофимов, К. А. Некрасова, С. В. Родин, Е. А. Атанесян, Е. А. Карabanова, М. С. Захаров, А. С. Симбирицев, А. М. Ищенко</i>	
Комплемент при патологиях, возможность коррекции с помощью нового гуманизованного антитела, блокирующего альтернативный путь	754
<i>О. Ю. Дзех, А. И. Лазарев</i>	
Состояние локального иммунитета у подростков с хроническим гингивитом	757
<i>С. В. Диндяев, Ф. А. Ромашин, Д. В. Касаткин</i>	
Тучные клетки в системе регуляции матки крыс	760
<i>А. В. Евдокимов</i>	
Распределение трёхлокусных гаплотипов TLR10–TLR1–TLR6 в популяции татар Челябинской области в сравнении с популяциями Евразии	763
<i>В. В. Емельянов, С. А. Бриллиант, И. Ф. Гетте, И. Г. Данилова, Л. П. Сидорова, Т. А. Цейтлер</i>	
Влияние препаратов группы 1, 3, 4-тиадиазины на фракции лейкоцитов крыс с сахарным диабетом 2 типа	766
<i>О. В. Ермакова, Н. Б. Орлов, А. Н. Трунов, В. И. Коненков, В. В. Черных</i>	
Дисбаланс содержания цитокинов и факторов роста во внутриглазной жидкости при первичной открытоугольной глаукоме	769
<i>С. В. Зиновьев, Н. Г. Плехова, Н. М. Кондрашова</i>	
Варианты гибели клеток местного иммунитета при хронической обструктивной болезни легких	772
<i>Е. Ю. Златник, А. Ю. Максимов, А. С. Гончарова, Н. С. Карнаухов</i>	
Разработка моделей роста злокачественных опухолей человека для клеточной иммунотерапии	775
<i>А. В. Зурочка, В. А. Зурочка, М. А. Добрынина, Л. О. Фомина, О. И. Забков, В. А. Гриценко</i>	
Иммунобиологические свойства синтетических аналогов гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ)	778
<i>В. А. Зурочка, А. В. Зурочка, Л. О. Фомина, М. А. Добрынина, О. И. Забков, В. А. Гриценко</i>	
Киноцидины – цитокины, обладающие антибактериальной и противовирусной активностью	781
<i>В. В. Илюха, Б. Ларкин, А. П. Прохорова, А. Н. Полторак</i>	
Активация STING в Т клетках приводит к UPR и клеточной смерти	784
<i>Н. С. Ираклионова, Э. Б. Белан, С. В. Туркина, Е. Л. Рудобаба</i>	
Особенности продукции IL-4 и IL-10 при воспалительных заболеваниях верхнего отдела желудочно-кишечного тракта	786
<i>Л. Р. Кальметьева, Л. Г. Ибрагимова, Д. Д. Пролыгина</i>	
Роль NGAL для прогнозирования повреждения почек в педиатрической практике	789
<i>В. С. Каплин, Г. М. Сысоева, Л. В. Гридунова, Н. И. Кулешова, Л. Р. Лебедев</i>	
Влияние куриных желточных иммуноглобулинов на выносливость мышей	792

<i>П. А. Кобызева, М. А. Стрельцова, С. А. Ерохина, Е. И. Коваленко</i>	
Свойства субпопуляций натуральных киллеров человека, обладающих маркерами адаптивных клеток	795
<i>Е. В. Колбина, Ю. С. Шишкова, Е. А. Мезенцева, И. А. Колбин</i>	
Микробицидный эффект секреторных продуктов нейтрофилов по отношению к представителям резидентной и условно-патогенной флоры тела человека	798
<i>О. А. Коленчукова, С. В. Столяр, Л. П. Ладынина</i>	
Исследование функциональных характеристик нейтрофильных гранулоцитов при воздействии железосодержащих наночастиц ферригидрита	801
<i>О. А. Коленчукова, И. И. Гвоздев, Е. Н. Бирюкова, О. С. Сутормин, Л. В. Степанова, С. В. Смирнова</i>	
Биолюминесцентные и хемилюминесцентные маркеры слюны для оценки уровня работоспособности спортсменов	804
<i>А. А. Колобов, Т. А. Сазонова, Г. В. Александров, А. В. Петров</i>	
Модель псориазоподобного поражения кожи у мышей при внутрикожном введении рекомбинантного ИЛ-36 γ человека	807
<i>Е. Н. Конопля, Д. В. Поляков, С. А. Лосенок</i>	
Иммунные нарушения при внебольничной пневмонии	810
<i>А. К. Красильникова, А. И. Малышкина, Н. Ю. Сотникова, Ю. С. Анциферова</i>	
Синтез и продукция Th2 цитокинов на системном и локальном уровне у пациенток с бесплодием и эндометриозом	813
<i>И. М. Криволапова, И. А. Пашнина, В. А. Черешнев</i>	
Выявляемость антинуклеарного фактора у здоровых детей и взрослых	816
<i>Е. А. Кривонкина, С. М. Юдина, А. М. Бахирев</i>	
Цитокины в патогенезе спонтанной крапивницы	819
<i>О. В. Крячко, Р. М. Хоменко</i>	
Реакция клеточных факторов врожденного и адаптивного иммунитета поросят на введение препарата «Анандин»	822
<i>О. В. Крячко, Л. А. Лукьянова, А. М. Таран</i>	
Функциональная активность нейтрофилов крови кроликов при одиночных и комбинированных стрессорных воздействиях	825
<i>Ю. В. Кудревич, Е. К. Кузнецова, О. Р. Зиганшин, И. Л. Батурина, И. В. Емельянов</i>	
Изменения показателей системного иммунитета при проведении косметологических процедур, оказывающих воздействие на качество кожи	828
<i>Ю. В. Кудревич, Е. К. Кузнецова, О. Р. Зиганшин, Г. В. Сычугов, Т. А. Заяц, А. И. Емелина</i>	
Сравнительная характеристика показателей системного иммунитета и иммунитета кожи до и после процедуры биоревитализации	831
<i>Т. А. Кудрявцева, Э. А. Старикова, И. В. Воронкина, В. С. Смирнов</i>	
Влияние глутамил-триптофана на секрецию цитокинов, параметры ранозаживления и антиоксидантную систему <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i>	834
<i>М. С. Кузнецова, Ю. А. Лопатникова, С. В. Сенников</i>	
Фенотипирование антиген-специфичных цитотоксических Т-лимфоцитов методом многоцветной проточной цитометрии	837
<i>Е. М. Куклина</i>	
Рецепторные функции Sema4D в контроле пролиферации Т-лимфоцитов	840
<i>В. В. Курилин, Ю. Н. Хантакова, В. П. Терещенко, Е. В. Куликова, В. С. Мелентьев, И. А. Облеухова</i>	
Эффекты VAY 11-7082 на формирование дендритных клеток <i>in vitro</i>	843

<i>С. И. Курчевенко, Г. М. Бодиенкова, О. Л. Лахман</i>	
Сравнительная характеристика субпопуляционного состава лимфоцитов и белка теплового шока у пациентов с вибрационной болезнью	846
<i>А. И. Лебедева, С. А. Муслимов, С. А. Афанасьев, Д. С. Кондратьева</i>	
Роль макрофагов в регенерации мышечных тканей, индуцированных аллогенным биоматериалом	849
<i>Е. А. Литвинова, К. М. Ачасова</i>	
Экспериментальная модель для изучения механизма независимой от лимфоцитов поляризации макрофагов в кишечнике мышей	852
<i>Н. Ю. Лотош, А. А. Селищева, Н. В. Воробьева</i>	
Стеариламин вызывает быстрое образование нейтрофильных внеклеточных ловушек (NETоз), не зависящее от активных форм кислорода	855
<i>Н. Е. Муругина, А. С. Будихина, П. В. Максимчик, Ю. А. Дагиль, Л. С. Балясова, В. В. Муругин, Г. З. Чкадуа, Б. В. Пинегин, М. В. Пащенко</i>	
Синергическое взаимодействие рецепторов NOD1 и TLR4 врожденного иммунитета	858
<i>С. Ю. Медведева, З. А. Шафигуллина, И. Г. Данилова</i>	
Состояние соединительнотканых элементов при диффузном токсическом повреждении печени и его коррекции	861
<i>Е. А. Мухлынина, О. В. Яковлева</i>	
Особенности реакции тучных клеток организма на хроническое местное воспаление	864
<i>И. В. Нестерова, Г. А. Чудилова, С. В. Ковалева, Л. В. Ломтатидзе, Т. В. Русинова, В. А. Тараканов, Н. К. Барова, В. Н. Павленко</i>	
Неоднозначность влияний регуляторных пептидов и рекомбинантного IFN α на фенотип субпопуляции CD66b ⁺ CD33 ⁺ CD16 ⁺ CD11b ⁺ нейтрофильных гранулоцитов в системе <i>in vitro</i>	867
<i>И. Ю. Никитина, Я. В. Сердюк, Т. А. Ненашева, В. А. Шорохова, Т. Р. Багдасарян, И. В. Лядова</i>	
Исследование влияния иммунологической реактивности на течение микобактериальной инфекции у больных туберкулезом легких	870
<i>М. А. Носенко, А. Ю. Архипова, К-С. Н. Атретханы, М. С. Друцкая, С. А. Недоспасов, М. М. Мойсенович</i>	
Использование биоматериалов на основе белков шелка для модуляции иммунного ответа	873
<i>М. А. Носенко, С. Г. Амбарян, С. А. Недоспасов, М. С. Друцкая</i>	
Фактор некроза опухолей в заживлении полнослойных ран кожи у мышей	876
<i>О. Б. Нузова, А. В. Студеникин, Ю. В. Филиппова, А. А. Стадников</i>	
Клинико-иммунологическая оценка эффективности использования милиацила и КВЧ-терапии при лечении гнойных ран у больных с сахарным диабетом	879
<i>Ж. П. Омашарифа, А. А. Конопля</i>	
Бесплодие трубного генеза: иммунные и метаболические нарушения на системном и местном уровне	882
<i>М. В. Осиков, Е. В. Симонян, М. С. Бойко</i>	
Влияние витамина D3 в составе ректальных суппозиторий на концентрацию IgG, IgM и IL-8 в сыворотке при экспериментальном язвенном колите	885
<i>А. А. Параскун, С. Ю. Виноградов</i>	
Динамика плотности пространственного распределения тучных клеток щитовидной железы в условиях прерывания лактации	888
<i>М. В. Пащенко, Н. Е. Муругина, Л. С. Балясова, А. С. Будихина, П. В. Максимчик, Ю. А. Дагиль, В. В. Муругин, Г. З. Чкадуа, Б. В. Пинегин</i>	
Метаболическое репрограммирование макрофагов, активированных агонистом рецептора NOD1	891

<i>В. А. Поздина, И. Г. Данилова</i>	
Морфологическая и функциональная разнородность макрофагов различной локализации у животных в норме и в условиях сахарного диабета I-го типа	894
<i>И. Г. Попова, С. Б. Назаров, Г. Н. Кузьменко, Н. В. Крошкина, О. Г. Ситникова, М. М. Клычева</i>	
Содержание эндотелиальных клеток-предшественников в пуповинной крови при преэклампсии	897
<i>О. А. Радаева, А. С. Симбирцев</i>	
Уровни цитокинов в сыворотке крови у больных эссенциальной артериальной гипертензией (ЭАГ) II стадии и риск формирования метаболического синдрома (МС)	900
<i>И. М. Ращупкин, М. А. Тихонова, Т. В. Тыринова, Л. В. Сахно, Е. Я. Шевела</i>	
Влияние кондиционных сред макрофагов на фенотип и пролиферацию клеток линии нейробластомы человека SH-SY5Y	903
<i>И. И. Рыбчинская, К. М. Иванов, Е. В. Ермолина, Н. Г. Шкатова</i>	
Уровень провоспалительных цитокинов у пациентов с послеоперационным гипотиреозом, осложненным гидроперикардом	906
<i>П. В. Самойликов, В. М. Бержец</i>	
Белковые экстракты из бобов сои и арахиса: фракционный состав и аллергенные свойства	909
<i>И. В. Самусева, А. Ю. Савочкина, К. В. Никушкина, И. В. Емельянов, Т. И. Никонова, М. А. Зотова</i>	
Оценка влияния эндонуклеазы на внеклеточные нейтрофильные ловушки	912
<i>Я. В. Сердюк, Т. А. Ненашева, И. Ю. Никитина, Н. Л. Карпина, И. В. Лядова</i>	
Популяционный состав нейтрофилов в условиях туберкулезного процесса	915
<i>Л. П. Сизякина, М. В. Харитонова</i>	
Роль В1 и В2 лимфоцитов в формировании различных вариантов ревматоидного артрита	918
<i>А. О. Ситковская, А. Б. Сагакянц, С. Ю. Филиппова, И. В. Межевова, Е. С. Бондаренко, К. Г. Стаценко, М. М. Попова</i>	
Влияние различных концентраций интерферона-гамма (ИФН- γ) на клетки иммунной системы <i>in vitro</i>	921
<i>А. О. Ситковская, И. В. Межевова, Е. С. Бондаренко, С. А. Колтаков, Е. П. Колпакова, А. А. Кармиргодиев, П. С. Панченко</i>	
Онколитический реовирус Р-92: эффект при генерации зрелых дендритных клеток (исследование <i>in vitro</i>)	924
<i>И. А. Снимщикова, Н. А. Кабина, М. О. Плотникова, И. А. Афонина, А. Д. Честныхина</i>	
Состояние JAK-STAT системы при гнойно-воспалительных заболеваниях мягких тканей	927
<i>К. В. Соколова, В. В. Емельянов, И. Ф. Гетте, М. Т. Абидов</i>	
Проявление регенераторного потенциала внеостровковых инсулин-синтезирующих клеток поджелудочной железы в условиях экспериментального диабета 2 типа и при введении аминофталгидразида	930
<i>Е. Д. Соловьева, Т. В. Тыринова, А. В. Калиновский, С. В. Мишинов, С. В. Чернов, В. В. Ступак</i>	
Исследование влияния дендритных клеток, нагруженных аутологичным лизатом опухоли больных злокачественными глиомами, на активацию антиген-специфического Т-клеточного иммунного ответа <i>in vitro</i>	933
<i>В. А. Сумеркина, Л. Ф. Телешева, Е. С. Головнева, И. Л. Батурина, Ю. В. Наймушина</i>	
Субпопуляционный состав лимфоцитов у пациентов с метаболическим синдромом и его изменение под влиянием адипокинов в экспериментальных условиях	936
<i>Ю. Г. Суховой, Е. Г. Костоломова, И. Г. Унгер, Т. В. Акунеева, И. А. Аптекарь</i>	
Модель влияния гипоксии на клеточную составляющую и синтез компонентов внеклеточного матрикса в культуре фибробластов	939

<i>Е. А. Ташкина, О. Ю. Леплина, Е. В. Баторов, А. А. Останин, Н. М. Пасман</i>	
Экспрессия рецепторов к сосудисто-эндотелиальному фактору роста-1 (VEGFR-1) и их роль в регуляции пролиферации Т-лимфоцитов	942
<i>В. П. Терещенко, Ю. Н. Хантакова, В. В. Курилин, А. Н. Силков, Р. А. Максюттов</i>	
Электропорация дендритных клеток ДНК-плазмидой, кодирующей ИЛ-10	945
<i>С. Ю. Терещенко, М. В. Смольникова</i>	
Интернет-зависимость у подростков Центральной Сибири	948
<i>В. Г. Фисенко, О. И. Фомина, П. Н. Боярская, А. Л. Пащенко, Е. А. Чагина</i>	
Определение уровня MMP 2, TIMP 2 и их соотношения у пациентов с острым повреждением почек (ОПП) до и после аортокоронарного шунтирования (АКШ)	951
<i>Т. А. Фишер, С. А. Петров, И. В. Фишер</i>	
Иммуноэндокринные и психологические механизмы адаптации во вновь сформированном коллективе	954
<i>Т. С. Хабалова, Э. А. Кащенко, Г. В. Селедцова</i>	
Иммунорегуляторные свойства и прорегенеративное действие микровезикул (МВ), продуцируемых мезенхимальными стволовыми клетками (МСК) в модели острой почечной недостаточности (ОПН) мышей	957
<i>Т. С. Хабалова, Э. А. Кащенко, Г. В. Селедцова</i>	
Влияние трансплантации мезенхимальных стволовых клеток (МСК) и ими продуцируемых микровезикул (МВ) на содержание Т-клеток памяти и Т-регуляторных клеток в модели острой почечной недостаточности (ОПН) мышей	960
<i>З. Ф. Хараева, Э. К. Азаматова, Ж. Т. Балаева, М. Т. Тлакадугова, З. А. Шомахова</i>	
Цитокиновый профиль сыворотки крови и миндалин у детей с хроническим тонзиллитом на фоне герпесвирусных инфекций	963
<i>С. П. Чумакова, М. В. Винс, О. И. Уразова, Е. Б. Букреева, А. А. Буланова, Е. Г. Чурина, А. В. Ситников, В. В. Новицкий</i>	
Содержание галектинов-2, -9 и субпопуляций моноцитов крови при патологии легких инфекционного и неинфекционного генеза	966
<i>И. Л. Шаравьева, С. В. Гейн</i>	
Роль эндогенной опиоидной системы в регуляции антителогенеза при хроническом холодовом стрессе	969
<i>И. Л. Шаравьева, С. П. Тендрякова</i>	
Эффекты острого холодового стресса на продукцию IFN γ и IL-12 спленоцитами мыши	972
<i>М. Н. Шатохин, М. Ю. Маврин, В. А. Рагулина, К. В. Хорляков</i>	
Иммунный статус при остром обструктивном и необструктивном пиелонефрите	975
<i>А. Н. Шелухина, Е. Н. Конопля, Е. В. Гаврилюк, В. П. Гаврилюк</i>	
Фармакологическая иммунореабилитация у пациентов с обструктивной болезнью лёгких региона Курской магнитной аномалии	978
<i>Ю. И. Шилов, А. П. Годовалов, Д. Ю. Шилов, С. Ю. Шилов, Daniel Eliáš</i>	
Влияние опсонин свежей и инактивированной при 56 °C сыворотки крови на зимозан-индуцированную продукцию активных форм кислорода лейкоцитами крыс	981
<i>С. Ю. Шилов, Ю. И. Шилов, Я. А. Туляев, С. Ю. Барков</i>	
Изменение показателей фагоцитоза с маркером ацидификации фагосом pHrodo™ при зимозановом перитоните у крыс	984
<i>Н. В. Шилова, Н. Р. Хасбиуллина, А. Ю. Нокель, М. М. Зиганишина, Н. В. Бовин</i>	
Гликоэреи в изучении гликан-белкового взаимодействия	987

<i>К. В. Шмагель</i>	
Регуляторные CD4 ⁺ Т-клетки, выделенные из пулов наивных клеток, клеток памяти и эффекторных лимфоцитов, сохраняют свойства своих субпопуляций	990
<i>А. А. Шульгинова, Г. Н. Рыжикова, И. И. Коломоец, В. А. Рагулина</i>	
Взаимосвязь иммунных и метаболических нарушений при хронической ишемии головного мозга	994
<i>А. А. Янковская, Л. В. Сахно, Е. Я. Шевела</i>	
Сравнительная характеристика продукции ММР-9 и TIMP-1 различными подтипами макрофагов	997
<i>С. И. Бажан, Д. В. Антонец, С. Г. Дудко, О. Н. Каплина, Л. И. Карпенко, А. А. Ильичёв</i>	
Исследование иммуногенности ДНК-вакцинных конструкций, кодирующих цитотоксические и Т-хелперные эпитопы вируса Эбола	1000
<i>Е. А. Боробова, Д. В. Антонец, Е. В. Старостина</i>	
Разработка кандидатной синтетической вакцины для иммунотерапии меланомы	1003
<i>Ю. М. Васильев</i>	
Обновление штаммового состава сезонных вакцин для ежегодной профилактики гриппа в последние годы	1006
<i>Ю. М. Васильев</i>	
Перспективы платформ иммуноадьювантов с управляемыми свойствами на модели вакцин для профилактики гриппа	1009
<i>Д. С. Воробьев, Е. С. Петухова, А. В. Сидоров, И. Б. Семенова, Ю. В. Волох, А. Ю. Леонова, Н. А. Михайлова</i>	
Рекомбинантный пневмолизин вызывает образование антител и защищает мышей от пневмококковой инфекции	1012
<i>Н. А. Михайлова, А. А. Калошин, Е. М. Зимина, Е. О. Калиниченко, А. В. Солдатенкова, Н. Г. Плеханова, Д. В. Виктор</i>	
Разработка и доклиническое исследование рекомбинантной вакцины синегнойной	1015
<i>Т. Н. Никитина, И. Е. Жук, В. И. Климов, Т. Ю. Козлова, Д. В. Горенков</i>	
Актуальные проблемы вакцинопрофилактики ВПЧ-ассоциированных заболеваний	1018
<i>М. А. Смердова, Ю. Ю. Андреев, А. П. Топтыгина</i>	
Особенности иммунного ответа на вакцинацию против кори у серонегативных взрослых	1021
<i>Е. В. Старостина, О. Н. Каплина, Л. И. Карпенко, С. Г. Дудко, С. И. Бажан</i>	
Исследование иммуногенности ДНК-вакцинных конструкций, кодирующих искусственные антигены вируса гриппа	1024
<i>Е. В. Зайцева, М. А. Болков, Л. И. Воронина</i>	
Вопросы социализации пациентов с ПИД	1028
<i>А. В. Нечкин</i>	
Скрининг на наследственные заболевания: беглый взгляд на отечественный и зарубежный опыт правового регулирования	1031
<i>И. А. Тузанкина, Л. И. Воронина, Е. В. Зайцева</i>	
Развитие технологий генетических исследований и консультирования по выявлению врожденных ошибок иммунитета: проблемы и пути их решения	1034
<i>Р. М. Хайруллина, Д. Д. Пролыгина, Л. Р. Кальметьева, Г. А. Давлетбаева, И. А. Мирсаяпова, Г. У. Макарова, Л. Г. Ибрагимова</i>	
Региональный регистр первичных иммунодефицитов Республики Башкортостан	1038
<i>А. А. Аклеев, В. С. Никифоров, Е. А. Блинова, И. И. Долгушин</i>	
Экспрессия генов иммунного ответа у лиц, подвергшихся хроническому радиационному воздействию, в отдалённые сроки	1042

<i>Е. А. Блинова, А. А. Аклеев, А. И. Котикова, М. А. Янишевская</i> Связь полиморфизмов генов с некоторыми показателями адаптивного иммунитета у лиц, подвергшихся хроническому радиационному воздействию	1045
<i>С. А. Бриллиант, Б. Г. Юшков, Н. В. Тюменцева</i> Изменение гемоглобинового профиля костного мозга и периферической крови крыс в условиях острого асептического воспаления	1048
<i>Н. А. Конопля, С. А. Долгарева, А. В. Сорокин, Г. Н. Рыжикова</i> Иммунная реактивность при токсическом поражении печени алкогольной этиологии	1051
<i>И. Д. Магамедов, Л. П. Пивоварова, О. Б. Арискина, С. П. Нохрин, В. В. Сорока</i> Маркеры воспаления и оксидативного стресса при лечении острой ишемии нижних конечностей	1054
<i>П. С. Новиков, Н. А. Черевко, О. А. Денисенко, С. Э. Кондаков</i> Роль <i>Candida albicans</i> в развитии пищевой гиперчувствительности и метаболических нарушений	1057
<i>Ю. С. Храмцова, Н. В. Тюменцева, Е. Н. Алтабаева, О. С. Арташян</i> Влияние различных видов физической нагрузки на структуру лимфоидных органов у крыс разного пола	1060
<i>Н. М. Шлепотина, О. Л. Колесников, Ю. С. Шишкова, И. В. Галагудин, А. Р. Ткачёва, В. В. Шарутин</i> Изучение антимикробного действия гексахлороплатината триметиламмония на <i>E. coli</i>	1063

Авторский указатель	1066
----------------------------	------

CONTENTS

Vol. 13 (22), No 2, 2019

Research Articles

- T. V. Abakumova, T. P. Gening, D. R. Dolgova, I. I. Antoneeva, S. O. Gening*
Influence of the levels of the pro-inflammatory cytokines on the formation of extracellular neutrophilic traps in disseminated ovarian cancer 706
- A. A. Alshevskaya, I. A. Belomestnova, J. V. Zhukova, O. A. Chumasova, N. S. Shkaruba, A. E. Sizikov, J. A. Sennikova, O. P. Vorobyova*
Co-expression of receptors to the alpha tumor necrosis factor alpha in T cell subpopulations in rheumatoid arthritis 709
- A. Yu. Artamonov, M. S. Sukhareva, P. M. Kopeykin, A. N. Sukhachev, T. A. Filatenkova, D. S. Orlov, O. V. Shamova*
Effects of proline-rich peptides on the functional activity of human leukocytes *in vitro* 712
- K. M. Achasova, E. A. Litvinova*
Muc2 knockout mice as a model for testing approaches to alter gut microbiota 715
- A. V. Bateneva, S. G. Gamaley, L. R. Lebedev, E. D. Danilenko*
Activation of interferon system gene transcription by yeast double-stranded RNA 718
- E. L. Bolkhovitina, A. S. Fedorina, A. O. Bogorodskiy, A. O. Smirnova, E. N. Chursanova, A. M. Sapozhnikov, V. I. Borshchevskiy, M. A. Shevchenko*
Investigation of neutrophil migration via lymphatic vessels in the course of *A. Fumigatus*-induced inflammation 721
- T. Yu. Bondarenko, V. A. Svyatchenko, V. A. Ternovoi*
Analysis of level expression of the human gene TIM-1 using real-time quantitative PCR 724
- Yu. V. Valieva, E. M. Kuklina*
Expression of plexin B1 by human T lymphocytes: role in the control of cell activation 727
- A. A. Vasilishina, A. V. Demyanov, V. S. Monahova, A. V. Zhakhov, A. V. Trofimov, E. S. Denisenko, K. A. Nekrasova, S. V. Rodin, A. S. Simbirtsev, A. M. Ischenko*
Generation and characterization of recombinant antibody against the complement C5a anaphylatoxin 730
- A. O. Vlasova*
Cytokine level in blood serum in patients with acquired angioedema 732
- N. V. Vorobjeva, V. V. Kulakov*
The role of DRP1 protein, responsible for mitochondrial fragmentation, in the oxidative burst and NETosis of human neutrophils 735
- E. V. Gavriilyuk, A. I. Konoplya, V. P. Mikhin, Y. V. Prokofieva, L. N. Serikova*
Immune disorders and arterial pressure patients with arterial hypertension 738
- O. N. Gein, T. V. Gavrilova, Ya. A. Kadochnikova, M. V. Chereshneva, V. A. Chereshnev*
Immune modulating effects of myelopeptides MP-5 and MP-6 under the stress conditions 741
- S. V. Gein*
 β -endorphin regulation of secretory activity of peritoneal cavity cells in mice under stress condition 744
- O. A. Gizinger, A. M. Korkmazov, M. Yu. Korkmazov, V. I. Karandashov, E. S. Zavgorodniy*
A monochromatic incoherent light of the 450 nm optical range affects the content of cytokines in the maxillary washes in rhinologic patients 747

<i>E. V. Gladkova</i>	
Characteristics of remodelling regulatory immune mechanisms in cartilage and bone tissues at incipient and late presentations of primary and post-traumatic osteoarthritis	750
<i>N. S. Glebezdina, I. V. Nekrasova, A. A. Olina, G. K. Sadykova</i>	
Contribution of different types of melatonin receptors to hormone-dependent regulation of T lymphocytes producing IL-17 (TH17) differentiation	753
<i>N. P. Gorbunov, A. V. Zhakhov, A. V. Trofimov, K. A. Nekrasova, S. V. Rodin, E. A. Atanesyan, E. A. Karabanova, M. S. Zakharov, A. S. Simbirtsev, A. M. Ischenko</i>	
Complement in pathologies, possibility of correction using a novel humanized antibody that can block alternative pathway of complement system activation	756
<i>O. Yu. Dzech, A. I. Lazarev</i>	
The state of local immunity in adolescents with chronic gingivitis	759
<i>S. V. Dindyaev, F. A. Romashin, D. V. Kasatkin</i>	
Mast cells in the system of uterus regulation in rats	762
<i>A. V. Evdokimov</i>	
Three-locus TLR10–TLR1–TLR6 haplotypes distribution in tatars of the Chelyabinsk region in comparison with the populations of Eurasia	765
<i>V. V. Emelyanov, S. A. Brilliant, I. F. Gette, I. G. Danilova, L. P. Sidorova, T. A. Tseitler</i>	
Influence of 1, 3, 4-tiadiazine group compounds on leukocyte fractions of type2 diabetic rats	768
<i>O. V. Ermakova, N. B. Orlov, A. N. Trunov, V. I. Konenkov, V. V. Chernykh</i>	
Imbalance in the content of cytokines and growth factors in the intraocular fluid in primary open-angle glaucoma	771
<i>S. V. Zinoviev, N. G. Plekhova, N. M. Kondrashova</i>	
The variants of death innate immunity cells in chronic obstructive lung disease obstructive lung	774
<i>E. Y. Zlatnik, A. Yu. Maksimov, A. S. Goncharova, N. S. Karnaukhov</i>	
Development of models of human malignant tumors for cellular immunotherapy	777
<i>A. V. Zurochka, V. A. Zurochka, M. A. Dobrynina, L. O. Fomina, O. I. Zabkov, V. A. Gritsenko</i>	
Immunobiological properties of synthetic analogues of granulotsitarno-makrofagal koloniestimulating factor (GM-CSF)	780
<i>V. A. Zurochka, A. V. Zurochka, L. O. Fomina, M. A. Dobrynina, O. I. Zabkov, V. A. Gritsenko</i>	
Cinetidine – cytokines, antibacterial and antiviral activity	783
<i>V. V. Ilyukha, B. Larkin, A. P. Prohorova, A. N. Poltorak</i>	
STING activation in T cells leads to UPR and cell death	785
<i>N. S. Iraklionova, E. B. Belan, S. V. Turkina, E. L. Rudobaba</i>	
The features of IL-4 and IL-10 production in upper gastrointestinal inflammatory diseases	788
<i>L. R. Kalmetyeva, L. G. Ibrahimova, D. D. Prolygina</i>	
The role of NGAL for predicting renal damage in pediatric practice	791
<i>V. S. Kaplin, G. M. Sysoeva, L. V. Gridunova, N. I. Kuleshova, L. R. Lebedev</i>	
The effect of chicken yolk immunoglobulin Y on increase in edurance of mice	794
<i>P. A. Kobyzeva, M. A. Streltsova, S. A. Erokhina, E. I. Kovalenko</i>	
Properties of human natural killer cell subpopulations expressing markers of adaptive cells	797
<i>E. V. Kolbina, Yu. S. Shishkova, E. A. Mezentseva, I. A. Kolbin</i>	
Microbicidal effect of secretory products of neutrophils in relation to representatives of resident and conditionally pathogenic microflora of a human body	800

<i>O. A. Kolenchukova, S. V. Stolyar, L. P. Ladygina</i>	
The study of the functional characteristics of neutrophilic granulocytes when exposed to iron-containing nanoparticles ferrihydrite	803
<i>O. A. Kolenchukova, I. I. Gvozdev, E. N. Birukova, O. S. Sutormin, L. V. Stepanova, S. V. Smirnova</i>	
Bioluminescent chemiluminescent markers for assessment of physical status of athletes for determination performance level	806
<i>A. A. Kolobov, T. A. Sazonova, G. V. Alexandrov, A. V. Petrov</i>	
The model of psoriasiform dermatitis in mice induced by intradermal administration of recombinant human IL-36 γ	809
<i>E. N. Konoplya, D. V. Polyakov, S. A. Losenok</i>	
Immune disorders in patients with community-acquired pneumonia	812
<i>A. K. Krasilnikova, A. I. Makyshkina, N. Yu. Sotnikova, Yu. S. Antziferova</i>	
Th2 type cytokines synthesis and production at systemic and local level in patients with infertility and endometriosis	815
<i>I. M. Krivolapova, I. A. Pashnina, V. A. Chereshnev</i>	
Prevalence of antinuclear antibodies in healthy children and adults	818
<i>A. E. Krivonkina, S. M. Yudina, A. M. Bahirev</i>	
Cytokines in the pathogenesis of spontaneous urticaria	821
<i>O. V. Kryachko, R. M. Khomenko</i>	
Reaction of cellular factors in innate and adaptive immunity of the piglets on the introduction of the drug «Anandin»	824
<i>O. V. Kryachko, L. A. Lukoyanova, A. M. Taran</i>	
Functional activity of neutrophils of blood of rabbits with single and combined stress impact	827
<i>Y. V. Kudrevich, E. K. Kuznetsova, O. R. Ziganshin</i>	
Changes in the indices of systemic immunity during cosmetic procedures affecting the quality of the skin	830
<i>Y. V. Kudrevich, E. K. Kuznetsova, O. R. Ziganshin, G. V. Sychugov, T. A. Zayats, A. I. Emelina</i>	
Comparative characteristics of the indices of systemic immunity and skin immunity before and after the procedure of biorevitalization	833
<i>T. A. Kudriavtceva, E. A. Starikova, I. V. Voronkina, V. S. Smirnov</i>	
Influence of glutamyl-tryptophan on cytokine secretion, wound healing, and antioxidant system <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i>	836
<i>M. S. Kuznetsova, J. A. Lopatnikova, S. V. Sennikov</i>	
Phenotyping of antigen-specific cytotoxic T-lymphocytes by the method of multicolor flow cytometry	839
<i>E. M. Kuklina</i>	
Receptor functions of Sema4D in the control of T-lymphocyte proliferation	842
<i>V. V. Kurilin, Yu. N. Khantakova, V. P. Tereshchenko, E. V. Kulikova, V. S. Melentiev, I. A. Obleukhova</i>	
Effects of BAY 11-7082 on the formation of immunosuppressor dendritic cells <i>in vitro</i>	845
<i>S. I. Kurchevenko, G. M. Bodienkova, O. L. Lakhman</i>	
Comparative characteristics of the subpopulation composition of lymphocytes and heat shock protein in patients with vibration disease	848
<i>A. I. Lebedeva, S. A. Muslimov, S. A. Afanasiev, D. S. Kondratieva</i>	
The role of macrophages in regeneration of muscle tissue induced by allogenic biomaterial	851
<i>E. A. Litvinova, K. M. Achasova</i>	
Experimental model for the study of a independent from the lymphocytes of polarization intestinal macrophages in the mice	854

<i>N. Y. Lotosh, A. A. Selischeva, N. V. Vorobjeva</i>	
Stearylamine activates rapid and ROS-independent formation of neutrophil extracellular traps (NETosis)	857
<i>N. E. Murugina, A. S. Budikhina, P. V. Maximchik, Y. A. Dagil, L. S. Balyasova, V. V. Murugin, G. Z. Chkadua, B. V. Pinegin¹, M. V. Pashenkov</i>	
Synergistic interactions of NOD1 and TLR4 receptors of innate immunity	860
<i>S. Yu. Medvedeva, Z. A. Shafigullina, I. G. Danilova</i>	
The state of connective tissue elements of the liver with diffuse toxic damage and its correction	863
<i>E. A. Mukhlinina, O. V. Yakovleva</i>	
Some features of mast cell reaction on chronic local inflammation	866
<i>I. V. Nesterova, G. A. Chudilova, S. V. Kovaleva, L. V. Lomtadze, T. V. Rusinova, V. A. Tarakanov, N. K. Barova, V. N. Pavlenko</i>	
Influency of influences of regulatory peptides and recombinant IFN α on the phenotype of the subset CD66b ⁺ CD33 ⁺ CD16 ⁺ CD11b ⁺ neutrofil granulocytes <i>in vitro</i>	869
<i>I. Y. Nikitina, Y. V. Serduk, T. A. Nenasheva, V. A. Shorochova, T. R. Bagdasarian, I. V. Lyadova</i>	
The influence of immunological reactivity to the mycobacterial infection process in patients with pulmonary tuberculosis	872
<i>M. A. Nosenko, A. Y. Arkhipova, K-S.N. Atretkhany, M. S. Drutskaya, S. A. Nedospasov, M. M. Moisenovich</i>	
Silk-based biomaterials for modulation of immune response	875
<i>M. A. Nosenko, S. G. Ambaryan, S. A. Nedospasov, M. S. Drutskaya</i>	
Tumor necrosis factor in regeneration of deep skin wounds in mice	877
<i>O. B. Nuzova, A. V. Studenikin, Yu. V. Filippova, A. A. Stadnikov</i>	
Clinical and immunological evaluation of the effect of using miliacil and EHF-therapy in the treatment of purulent wounds in patients with diabetes	881
<i>B. G. Omasharifa Po, A. Φ. Konoplya</i>	
Infertility of pipe genesis: immune and metabolic disorders at the system and local level	884
<i>M. V. Osikov, E. V. Simonyan, M. S. Boyko</i>	
The influence of vitamin D3 as part of a new dosage form for IgG, IgM, IL-8 in blood serum in experimental ulcerative colitis	887
<i>A. A. Paraskun, S. Yu. Vinogradov</i>	
Dynamics of density of spatial distribution of mast cells of the thyroid gland in conditions of interruption of lactation	890
<i>M. V. Pashenkov, N. E. Murugina, A. S. Budikhina, P. V. Maximchik, Y. A. Dagil, L. S. Balyasova, V. V. Murugin, G. Z. Chkadua, B. V. Pinegin</i>	
Metabolic reprogramming of macrophages activated by a NOD1 receptor agonist	892
<i>V. A. Pozdina, I. G. Danilova</i>	
Morphological and functional diversity of macrophages of different localization in animals in normal and in conditions of diabetes mellitus type I	896
<i>I. G. Popova, S. B. Nazarov, G. N. Kuzmenko, N. V. Kroshkina, O. G. Sitnikova, M. M. Klycheva</i>	
Content of endothelial progenitor cells in umbilical cord blood in preeclampsia	899
<i>O. A. Radaeva, A. S. Simbirtsev</i>	
Levels of peripheral blood cytokines and the risk for metabolic syndrome in patients with stage II essential hypertension	902
<i>I. M. Rashchupkin, M. A. Tikhonova, T. V. Tyrinova, L. V. Sakhno, E. Ya. Shevela</i>	
Effect of macrophage condition media on phenotype and proliferation of human neuroblastoma cell line SH-SY5Y	905

<i>I. I. Rybchinskaya, K. M. Ivanov, E. V. Ermolina, N. G. Shkatova</i>	
The level of proinflammatory cytokines in patients with postoperative hypothyroidism complicated by hydropericard	908
<i>P. V. Samoylikov, V. M. Berzhets</i>	
Protein extracts from beans of soy and peanut: fractional composition and allergenic properties	911
<i>I. V. Samuseva, A. Y. Savochkina, K. V. Nikushkina, I. V. Yemelyanov, T. I. Nikonova, M. A. Zotova</i>	
Evaluation of the effect of endonuclease on extracellular neutrophilic traps	914
<i>Y. V. Serdyuk, T. A. Nenasheva, I. Yu. Nikitina, N. L. Karpina, I. V. Lyadova</i>	
Population composition of neutrophils in the tuberculous process	917
<i>L. P. Sizyakina, M. V. Kharitonova</i>	
The role of B1 and B2 lymphocytes in the formation of different variants of rheumatoid arthritis	920
<i>A. O. Sitkovskaya, A. B. Sagakyants, S. Yu. Filippova, I. V. Mezhevoval, E. S. Bondarenko, K. G. Statsenko, M. M. Popova</i>	
Influence of different interferon-gamma (IFN- γ) concentrations on cells of the immune system <i>in vitro</i>	923
<i>A. O. Sitkovskaya, I. V. Mezhevoval, E. S. Bondarenko, S. A. Kolpakov, E. P. Kolpakova, A. A. Karmirgodiev, P. S. Panchenko</i>	
Oncolytic reovirus R-92: effect in the generation of mature dendritic cells (research <i>in vitro</i>)	926
<i>I. A. Snimschikova, N. A. Khabina, M. O. Plotnikova, I. A. Afonina, A. D. Chestnihina</i>	
Condition of JAK-STAT system in purulent-inflammatory diseases of soft tissues	929
<i>K. V. Sokolova, I. F. Gette, V. V. Emelyanov, M. T. Abidov</i>	
Manifestation of regenerative potential of extra-islet insulin-producing pancreatic cells at the experimental diabetes type2 and at administration of 3-aminophthalhydrazide	932
<i>E. D. Soloveva, T. V. Tyrinova, A. V. Kalinovskiy, S. V. Mishinov, S. V. Chernov, V. V. Stupak</i>	
The study of ability of dendritic cells loaded with autologous tumor lysate of patient with high-grade glioma to activate antigen-specific T-cell response <i>in vitro</i>	935
<i>V. A. Sumerkina, L. F. Telesheva, E. S. Golovneva, I. L. Baturina, Yu. V. Naimushina</i>	
Lymphocyte subpopulation profile in patients with metabolic syndrome and its change under the influence of adipokines in experimental conditions	938
<i>U. G. Suhovej, E. G. Kostolomova, I. G. Unger, T. V. Akuneeva, I. A. Aptekar</i>	
Model of influence of hypoxia on the cellular component and synthesis components of extracellular matrix in culture fibroblasts	941
<i>E. A. Tashkina, O. Yu. Leplina, E. V. Batorov, A. A. Ostanin, N. M. Pasman</i>	
Expression of vascular endothelial growth factor receptors 1 (VEGFR-1) and their role in the regulation of T cell proliferation	944
<i>V. P. Tereshchenko, J. N. Khantakova, V. V. Kurilin, A. N. Silkov, R. A. Maksyutov</i>	
Dendritic cells electroporation with DNA-plasmid encoding IL-10	947
<i>S. Y. Tereshchenko, M. V. Smolnikova</i>	
Internet dependence in adolescents of Central Siberia	950
<i>Fisenko V. G., Fomina O. I., Boyarskaya P. N., Paschenko A. L., Chagina E. A.</i>	
The determination of MMP-2, TIMP-2 levels and its ratio in blood serum in patients with AKI before and after coronary artery bypass grafting	953
<i>T. A. Fisher, S. A. Petrov, I. V. Fisher</i>	
Immune-endocrine and psychological mechanisms of adaptation in a formed collective	956
<i>T. S. Khabalova, E. A. Kaschenko, G. V. Seledtsova</i>	
Effect of transplantation of mesenchymal stem cells (MSC) and produced microvesicles (MV) on the maintenance of memory T-cells and T-regulatory cells in the model acute renal failure in mice	959

<i>T. S. Khabalova, E. A. Kaschenko, G. V. Seledtsova</i>	
Effect of transplantation of mesenchymal stem cells (MSC) and produced microvesicles (MV) on the maintenance of memory T-cells and T-regulatory cells in the model acute renal failure in mice	962
<i>Z. F. Kharaeva, E. K. Azamatova, J. T. Balaeva, M. T. Tlakadugova, Z. A. Shomakhova</i>	
Cytokine profile of serum and tonsils in children with chronic tonsillitis in the background of herpesvirus infections	965
<i>S. P. Chumakova, M. V. Vins, O. I. Urazova, E. B. Bukreeva, A. A. Bulanova, E. G. Churina, A. V. Sitnikova, V. V. Novitsky</i>	
Content of galectins-2, -9 and subpopulations of blood monocytes in pathology of lung infectious and non-infectious genesis	968
<i>I. L. Sharav'eva, S. V. Gein</i>	
The role of the endogenous opioid system in the regulation of antibody genesis during chronic cold stress	971
<i>I. L. Sharav'eva, S. P. Tendryakova</i>	
Effects of acute cold stress on IFN γ and IL-12 production by mice splenocytes	974
<i>M. N. Shatokhin, M. Yu. Mavrin, V. A. Ragulina, K. V. Khorlyakov</i>	
Immune status in acute obstructive and nonobstructive pyelonephritis	977
<i>A. N. Shelukhina, E. N. Konoplya, E. V. Gavrilyuk, V. P. Gavrilyuk</i>	
Pharmacological immunorehabilitation patients with obstructive lung disease in the region of Kursk magnetic anomaly	980
<i>Ju. I. Shilov, A. P. Godovalov, D. Ju. Shilov, S. Ju. Shilov, Daniel Eliáš</i>	
Influence of opsonins of fresh and inactivated under 56 °C blood serum on zymosan-induced production of reactive oxygen species by rat leucocytes	983
<i>S. Ju. Shilov, Ju. I. Shilov, Ya. A. Tulyaev, S. Yu. Barkov</i>	
Changes in phagocytosis parameters with a marker of phagosome acidification pHrodo™ under-zymosan-induced peritonitis in rats	986
<i>N. V. Shilova, N. R. Khasbiullina, A. Yu. Nokel, M. M. Ziganshina, N. V. Bovin</i>	
Glycoarrays for studying of glycan-protein interaction	989
<i>K. V. Shmagel</i>	
Regulatory CD4 ⁺ T cells isolated from naive, memory and effector lymphocyte subsets keep the properties of appropriate subpopulations	993
<i>A. A. Shulginova, G. N. Ryzhikova, I. I. Colomoets, V. A. Ragulina</i>	
Relationship of immune and metabolic disorders in chronic ischemia of the brain	996
<i>A. A. Yankovskaya, L. V. Sakhno, E. Ya. Shevela</i>	
Comparative characterization of MMR-9 and TIMP-1 production by different macrophages subsets	998
<i>S. I. Bazhan, D. V. Antonets, S. G. Dudko, O. N. Kaplina, L. I. Karpenko, A. A. Ilyichev</i>	
Immunogenicity of DNA vaccine constructs encoding Ebola virus cytotoxic and T-helper epitopes	1002
<i>E. A. Borobova, D. V. Antonets, E. V. Starostina</i>	
Development of a candidate synthetic vaccine for immunotherapy of melanoma	1005
<i>Y. M. Vasiliev</i>	
Seasonal influenza vaccine strain recommendations in recent years	1008
<i>Y. M. Vasiliev</i>	
Perspectives of immune adjuvant platforms with adjustable properties for influenza vaccines	1011
<i>D. S. Vorobyev, E. S. Petukhova, A. V. Sidorov, I. B. Semenova, Yu. V. Volokh, A. Yu. Leonova, N. A. Mikhailova</i>	
Recombinant pneumolysin induces the formation of antibodies and protects mice from pneumococcal infection	1014

<i>N. A. Mikhailova, A. A. Kaloshin, E. M. Zimina, E. O. Kalinichenko, A. V. Soldatenkova, N. G. Plekhanova, L. V. Victorov</i>	
Obtaining and preclinical studies of recombinant pseudomonas vaccine	1017
<i>T. N. Nikitina, I. E. Zhuk, V. I. Klimov, T. Yu. Kozlova, D. V. Gorenkov</i>	
Actual problems of vaccine prophylaxis of HPV-related diseases	1020
<i>M. A. Smerdova, Yu. Yu. Andreev, A. P. Toptygina</i>	
Peculiarities of immune response to measles vaccination in seronegative adults	1023
<i>E. V. Starostina, O. N. Kaplina, L. I. Karpenko, S. G. Dudko, S. I. Bazhan</i>	
Immunogenicity of DNA vaccine constructs encoding influenza virus artificial antigens	1026
<i>E. V. Zaitseva, M. A. Bolkov, L. I. Voronina</i>	
Questions of socialization of patients with PID	1030
<i>A. V. Nechkin</i>	
Screening for hereditary diseases: a brief look at domestic and foreign experience in legal regulation	1033
<i>I. A. Tuzankina, L. I. Voronina, E. V. Zaitseva</i>	
Development of technologies of genetic research and consultation on the identification of congenital immunity errors: problems and their solutions	1037
<i>R. M. Khairullina, D. D. Prolygina, L. R. Kalmetyeva, G. A. Davletbaeva, I. A. Mirsayapova, G. U. Makarova, L. G. Ibragimova</i>	
Regional register of primary immunodeficiencies of the Republic of Bashkortostan	1040
<i>A. A. Akleyev, V. S. Nikiforov, E. A. Blinova, I. I. Dolgushin</i>	
Expression of immune response genes in chronically irradiated persons at late period after exposure	1044
<i>E. A. Blinova, A. A. Akleyev, A. I. Kotikova, M. A. Yanishevskaya</i>	
Association of gene polymorphisms with some indicators of adaptive immunity in chronically exposed persons	1047
<i>S. A. Brilliant, B. G. Yushkov, N. V. Tyumentseva</i>	
Modification hemoglobin profile the bone marrow and peripheral blood at rats in conditions of acute aseptic inflammation	1050
<i>N. A. Konoplya, S. A. Dolgareva, A. V. Sorokin, G. N. Ryzhikova</i>	
Immune reactivity in toxic liver damage of alcohol etiology	1053
<i>I. D. Magamedov, L. P. Pivovarova, O. B. Ariskina, S. P. Nohrin, V. V. Soroka</i>	
Markers of inflammation and oxidative stress in the treatment of acute ischemia of the lower limbs	1056
<i>P. S. Novikov, N. A. Cherevko, O. A. Denisenko, S. E. Kondakov</i>	
The role of <i>Candida albicans</i> in the development of food hypersensitivity and metabolic disorders	1059
<i>Y. S. Khramtsova, N. V. Tyumentseva, E. N. Altabaeva, O. S. Artashyan</i>	
The influence of different physical activity on the structure of lymphoid organs in rats of different sex	1062
<i>N. M. Shlepotina, O. L. Kolesnikov, Yu. S. Shishkova, I. V. Galagudin, A. R. Tkachyova, V. V. Sharutin</i>	
Studying the antimicrobial action of trimethylammonium hexachloroplatinate against <i>E. coli</i>	1064

Author Index	1066
---------------------	------

Раздел 2

ИММУННАЯ СИСТЕМА

ВЛИЯНИЕ УРОВНЯ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ НА ОБРАЗОВАНИЕ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ЛОВУШЕК ПРИ РАСПРОСТРАНЕННОМ РАКЕ ЯИЧНИКОВ

© 2019 г. Т. В. Абакумова^{1*}, Т. П. Генинг¹, Д. Р. Долгова¹,
И. И. Антонеева^{1,2}, С. О. Генинг^{1,2}

*E-mail: taty-abakumova@yandex.ru

¹ФГБОУ ВО Ульяновский государственный университет, Ульяновск, Россия;

²ГУЗ Областной клинический онкологический диспансер, Ульяновск, Россия

Поступила: 20.02.2019. Принята: 05.03.2019

Показано влияние IL-8 и IL-18 на способность циркулирующих нейтрофилов образовывать внеклеточные ловушки (НВЛ), способствующие пролиферации и метастазированию опухолевых клеток. Целью исследования явилась оценка влияния уровня IL-8 и IL-18 в сыворотке крови на образование НВЛ при распространенном раке яичников. Нами установлено, что повышение уровней провоспалительных цитокинов IL-8 и IL-18 в динамике прогрессирования РЯ сопровождается снижением числа НВЛ и повышением индекса НВЛ, формируемых циркулирующими нейтрофилами, что, возможно, свидетельствует о снижении киллерной функции последних.

Ключевые слова: нейтрофилы, внеклеточные нейтрофильные ловушки, рак яичников, IL-8, IL-18

DOI: 10.31857/S102872210006765-6

Адрес: 432017 Ульяновск, ул. Архитектора Ливчака, д. 2, ФГБОУ ВО Ульяновский государственный университет, Институт медицины, экологии и физической культуры. Абакумова Татьяна Владимировна.

Тел./факс: +7(8422) 327071.

E-mail: taty-abakumova@yandex.ru

Авторы:

Абакумова Т. В., к.б.н., доцент, доцент кафедры физиологии и патофизиологии ФГБОУ ВО Ульяновский государственный университет, Ульяновск, Россия;

Генинг Т. П., д.б.н., профессор, заведующая кафедрой физиологии и патофизиологии ФГБОУ ВО Ульяновский государственный университет, Ульяновск, Россия;

Долгова Д. Р., доцент, доцент кафедры физиологии и патофизиологии ФГБОУ ВО Ульяновский государственный университет, Ульяновск, Россия;

Антонеева И. И., д.м.н., доцент, профессор кафедры онкологии и лучевой диагностики ФГБОУ ВО Ульяновский государственный университет, Ульяновск, Россия, заведующая гинекологическим отделением ГУЗ ОКОД, Ульяновск, Россия;

Генинг С. О., аспирант кафедры онкологии и лучевой диагностики ФГБОУ ВО Ульяновский государственный университет, Ульяновск, Россия, врач-онколог отделения химиотерапии гемобластозов и солидных опухолей, Ульяновск, Россия.

В настоящее время конкретных стратегий скрининга или профилактики рака яичников не

существует и в большинстве случаев диагностируется поздняя стадия развития опухоли. Плохой прогноз эпителиальной карциномы яичника связывают с повышенным уровнем IL-8 и IL-18 [1, 2]. Последние усиливают ангиогенез, метастазирование эпителиальной карциномы яичника [3]. Доказана неоднозначная роль нейтрофилов (Нф) в развитии рака [4]. IL-18 и IL-8 способны модулировать функции Нф, индуцируя образование нейтрофильных внеклеточных ловушек (НВЛ) [5]. Рядом исследований показана важная роль НВЛ в развитии и метастазировании опухоли [6].

Целью исследования явилась оценка влияния уровня IL-8 и IL-18 в сыворотке крови на образование внеклеточных ловушек периферическими нейтрофилами при распространенном раке яичников (РЯ).

Объектом исследования явились Нф периферической крови 30 больных РЯ, проходившие лечение в Ульяновском областном клиническом онкологическом диспансере. В группу контроля вошли практически здоровые женщины (n=15). Для подсчета внеклеточных ловушек нейтрофилов, выделенных из периферической

крови использовали метод Долгушина И. И. с соавт. (2010). Определяли активность фагоцитоза (АФ, %) и индекс фагоцитоза (ИФ, у.е.), число (ЧНЛ, %) и индекс нейтрофильных ловушек (ИНЛ, у.е.) [7]. Уровень спонтанной продукции ИЛ-8 и ИЛ-18 определяли твердофазным иммуноферментным методом в сыворотке крови (ЗАО «Вектор-Бест-Волга», Россия). Связь между параметрами анализировали с использованием критерия Манна-Уитни ($p \leq 0,05$) и коэффициента корреляции Спирмена (r).

Нами установлено, что на III стадии РЯ на фоне повышенного уровня ИЛ-8 ($22,49 \pm 1,17$ пг/мл ($17,938 - 28,039$) против $12,45 \pm 2,73$ пг/мл ($7,848 - 23,188$) в контроле, $p = 0,0006$) и ИЛ-18 ($538,18 \pm 111,10$ пг/мл ($216,249 - 1518,002$) против $310,70 \pm 92,75$ пг/мл ($0 - 874,858$), $p = 0,0364$) увеличивается количество Нф со сниженным ИФ ($1,09 \pm 0,04$ у.е. против $1,52 \pm 0,07$ у.е. в контроле, $p = 0,0001$) и ЧНЛ ($0,94 \pm 0,20$ у.е. против $1,50 \pm 0,29$ у.е. в контроле, $p = 0,0169$). Выявлена корреляционная связь средней силы между уровнем ИЛ-18 и ИФ ($r = -0,4181$).

На IV стадии РЯ наблюдается дальнейшее повышение ИЛ-8 (до $83,94 \pm 23,51$ пг/мл ($29,934 - 132,667$)) и ИЛ-18 (до $581,56 \pm 123,81$ пг/мл ($123,81 - 1064,57$)). При этом количество Нф снижается практически до контроля. Однако ИНЛ значимо увеличивается относительно группы контроля ($12,8 \pm 5,31\%$ против $1,33 \pm 0,33\%$, $p = 0,0072$). Выявлена сильная корреляционная связь уровня ИЛ-8 с индексом ловушек ($r = 0,6000$).

Таким образом, повышение уровней провоспалительных цитокинов ИЛ-8 и ИЛ-18 в динамике прогрессирования РЯ сопровождается снижением ЧНЛ и повышением ИНЛ, формируемых циркулирующими Нф, что, возможно, свидетельствует о снижении киллерной функции последних.

Работа выполнена при поддержке гранта Президента РФ (МК-3196.2018.7).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. *Sanguinete M. M. M., Oliveira P. H., Martins-Filho A., Micheli D. C., Tavares-Murta B. M., Murta E. F. C., Nomenclini R. S.* Serum IL-6 and IL-8 Correlate with Prognostic Factors in Ovarian Cancer. *Immunol Invest.* 2017; 46(7); 677–688. doi: 10.1080/08820139.2017.1360342.
2. *Medina L., Rabinovich A., Piura B., Dyomin V., Levy R. S., Huleihel M.* Expression of IL-18, IL-18 binding protein, and IL-18 receptor by normal and cancerous human ovarian tissues: possible implication of IL-18 in the pathogenesis of ovarian carcinoma. *Mediators Inflamm.* 2014; 2014:914954. doi: 10.1155/2014/914954.
3. *Yin J., Zeng F., Wu N., Kang K., Yang Z., Yang H.* Interleukin-8 promotes human ovarian cancer cell migration by epithelial-mesenchymal transition induction in vitro. *Clin Transl Oncol.* 2015; 17(5); 365–70. doi: 10.1007/s12094-014-1240-4.
4. *Coffelt S. B., Wellenstein M. D., de Visser K. E.* Neutrophils in cancer: neutral no more. *Nat Rev Cancer.* 2016; 16(7); 431–46. doi: 10.1038/nrc.2016.52.
5. *Garley M., Jabłońska E., Surażyński A., Grubczak K., Ratajczak-Wrona W., Iwaniuk A., Dabrowska D., Palaka J. A., Moniuszko M.* Cytokine Network & NETs. *Folia Biol (Praha).* 2017; 63(5–6); 182–189.
6. *Erpenbeck L., Schön M. P.* Neutrophil extracellular traps: protagonists of cancer progression? *Oncogene.* 2017; 36(18); 2483–2490. doi: 10.1038/onc.2016.406.
7. *Долгушин И. И., Шишкова Ю. С., Семенова А. Б., Казачков Е. Л., Важенин А. В., Шаманова А. Ю., Димов Г. П.* Взгляд на роль нейтрофильного внеклеточного ДНК, как компонента микроокружения опухоли, в процессах канцерогенеза. *Уральский медицинский журнал.* 2014, 2(116), 19–22. [*Dolgushin I. I., Shishkova Y. S., Semenova A. B., Kazachkov E. L., Vagenin A. V., Shamanova A. Y., Dimov G. P.* View on the role of neutrophils extracellular DNA as a component of the microenvironment of tumor in the process of carcinogenesis. *Ural Medical Journal.* 2014; 2(116); 19–22.]

**INFLUENCE OF THE LEVELS OF THE PRO-INFLAMMATORY CYTOKINES
ON THE FORMATION OF EXTRACELLULAR NEUTROPHILIC TRAPS
IN DISSEMINATED OVARIAN CANCER**

© 2019 T. V. Abakumova^{1*}, T. P. Gening¹, D. R. Dolgova¹,
I. I. Antoneeva^{1,2}, S. O. Gening^{1,2}

*E-mail: taty-abakumova@yandex.ru

¹Ulyanovsk State University, Ulyanovsk, Russia;

²Regional Clinical Oncologic Center, Ulyanovsk, Russia

Received: 20.02.2019. **Accepted:** 05.03.2019

The effect of IL-8 and IL-18 on the ability of circulating neutrophils to form extracellular traps (NET), contributing to the proliferation and metastasis of tumor cells, is shown. The aim of the study was to evaluate the effect of IL-8 and IL-18 in serum on the formation of NETs in advanced ovarian cancer. We have found that an increase in the levels of pro-inflammatory cytokines IL-8 and IL-18 in the dynamics of progression of OC is accompanied by a decrease in the number of NETs and an increase in the index of NET formed by circulating neutrophils, which may indicate a decrease in the killer function of the latter.

Key words: neutrophils, extracellular neutrophil traps, ovarian cancer, IL-8, IL-18

Authors:

Abakumova T. V., ✉ Ph.D., Associate Professor at the Department of Physiology and Pathophysiology, UISU, Ulyanovsk, Russia.

E-mail: taty-abakumova@yandex.ru;

Gening T. P., Doctor of Biological sciences, Professor, Head of the Department of Physiology and Pathophysiology, UISU, Ulyanovsk, Russia;

Dolgova D. R., Ph.D., Associate Professor at the Department of Physiology and Pathophysiology, UISU, Ulyanovsk, Russia;

Antoneeva I. I., Doctor of medical sciences, Associate Professor, professor at the department of oncology and radiology, UISU, Ulyanovsk, Russia, Head of the gynecological department of the Regional Clinical Oncology Center, Ulyanovsk, Russia;

Gening S. O., graduate student at the department of oncology and radiology, UISU, Ulyanovsk, Russia, Oncologist of the Department of Chemotherapy of Hemoblastosis and Solid Tumors, Ulyanovsk, Russia.

КО-ЭКСПРЕССИЯ РЕЦЕПТОРОВ К ФАКТОРУ НЕКРОЗА ОПУХОЛИ АЛЬФА В СУБПОПУЛЯЦИЯХ Т-КЛЕТОК ПРИ РЕВМАТОИДНОМ АРТРИТЕ

© 2019 г. А. А. Альшевская^{1*}, И. А. Беломестнова¹, Ю. В. Жукова¹,
О. А. Чумасова¹, Н. С. Шкаруба¹, А. Э. Сизиков¹,
Ю. А. Сенникова³, О. П. Воробьева^{1,2}

*E-mail: alkkina@yandex.ru

¹ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», Новосибирск, Россия;

²ФГАОУ ВО «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», Новосибирск, Россия;

³ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Новосибирск, Россия

Поступила: 04.03.2019. Принята: 15.03.2019

Фактор некроза опухоли альфа (TNF α) выступает как основной про-воспалительный цитокин в иммунных процессах при ревматоидном артрите (РА). При этом активность и функции TNF α могут регулироваться не только растворимыми рецепторами (которые действуют в основном как нейтрализаторы действия), но также количеством, плотностью и ко-экспрессией его мембраносвязанных рецепторов 1 и типа 2 (TNFR1 и TNFR2). Анализ параметров ко-экспрессии TNFR1 и TNFR2 у больных РА по сравнению со здоровыми донорами продемонстрировал, что изменения количества и ко-экспрессии рецепторов типа 1 и типа 2 для TNF-альфа на поверхности иммунокомпетентных клеток ассоциированы с показателями активности заболевания.

Ключевые слова: ревматоидный артрит, иммунорегуляторные цитокины, фактор некроза опухоли, Т-клетки, рецепторы к цитокинам

DOI: 10.31857/S102872210006764-5

Адрес: 630099 г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, д. 14, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», лаборатория молекулярной иммунологии, Альшевская Алина Анатольевна. Тел./факс: +7(383) 222-19-10

E-mail: alkkina@yandex.ru

Авторы:

Альшевская А. А., к.м.н., научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», Новосибирск, Россия;

Беломестнова И. А., аспирант лаборатории молекулярной иммунологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», Новосибирск, Россия;

Жукова Ю. В., аспирант лаборатории молекулярной иммунологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», Новосибирск, Россия;

Чумасова О. А., к.м.н., врач ревматологического отделения Клиники иммунопатологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», Новосибирск, Россия;

Шкаруба Н. С., к.м.н., врач ревматологического отделения Клиники иммунопатологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», Новосибирск, Россия;

Сизиков А. Э., д.м.н., заведующий ревматологическим отделением Клиники иммунопатологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», Новосибирск, Россия;

Сенникова Ю. А., к.м.н., доцент кафедры клинической иммунологии ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России;

Воробьева О. П., к.м.н., научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», Новосибирск, Россия; преподаватель кафедры клинической биохимии Института медицины и психологии им. В. Зельмана Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия.

ВВЕДЕНИЕ

Фактор некроза опухоли альфа (TNF α) активно участвует в развитии и прогрессировании

хронического воспаления при ревматоидном артрите (РА). При этом изменение соотношения рецепторов разных типов к TNF α может привести к сдвигу баланса между проапоптотическими и пролиферативными сигнальными путями, что имеет решающее значение для воспалительных процессов при РА.

Целью исследования было проанализировать изменение параметров ко-экспрессии рецепторов 1 и 2 типа к TNF α у пациентов с РА на отдельных субпопуляциях клеток периферической крови, активно вовлеченных в иммунопатологические процессы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Проанализирована ко-экспрессия рецепторов к TNF α у 64 пациентов РА с высокой (78,1%), средней (12,5%) и низкой (9,4%) активностью заболевания в возрасте 22–83 лет (медиана (ИКР) 55 (45–65) года), среди которых 54 женщины (84,4%). В качестве контрольной группы использованы данные 46 условно-здоровых доноров в возрасте 18–7 лет (медиана (ИКР) 36,5 (30–54) года), среди которых 30 (65,2%) женщин. Для оценки уровня экспрессии и ко-экспрессии рецепторов 1 и 2 типа к TNF α использовались мононуклеарные клетки (МНК), выделенные из периферической крови.

Пробоподготовку проводили с помощью лизирующего буфера BD FACS Lysing Solution (кат. номер 349202; BD, США) согласно инструкции производителя. Оценка фенотипических характеристик проводилась методом проточной цитометрии (цитофлуориметр FACSVerse (BD, США)) с использованием моноклональных антител: CD3 APC/Cy7, CD19 PE/Cy7, CD8 APC/Cy7, CD14 PerCP, CD25 FITC, CD127 (IL-7R α) APC/Cy7, CD45RO FITC, CD45RA Pacific Blue, CD45 PerCP, CD4 Pe/Cy7 (BD Biosciences, США), TNFR1-PE, TNFR2-PE, TNFR1-APC, TNFR2-APC (R&D Systems, США). Обработка данных производилась с использованием программного обеспечения FACS Diva (BD, США). Для расчета абсолютного количества рецепторов на клетках использовали коммерческий набор BD QuantiBRITE PE (BD Biosciences, США).

Статистическая обработка полученных данных выполнена в программе Statistica 7.0, с использованием тестов Манна-Уитни и Краска-

ля-Уоллиса с поправкой на множественные сравнения. Корреляции между параметрами исследовались с помощью критерия Пирсона. Статистически значимыми различия считались при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

Полученные данные демонстрируют, что субпопуляции иммунокомпетентных клеток значительно различаются по показателям ко-экспрессии рецепторов 1 и 2 типа к TNF α . Установлено, что активированные Т-хелперные клетки и Т-регуляторные клетки экспрессируют наибольшее количество рецепторов обоих типов среди всех исследованных субпопуляций. Кроме того, среди Т-регуляторных клеток и Т-хелперных клеток памяти подавляющее большинство клеток (более 95%) экспрессирует хотя бы один из типов рецепторов к TNF, а наибольший процент дубль-позитивных клеток характерен для активированных цитотоксических Т-лимфоцитов.

Исследованы ассоциации между показателями тяжести и активности заболевания (индекс DAS-28, давность заболевания, рентгенологическая стадия, стадия активности, уровни РФ, АЦЦП и С-РБ, наличие системных проявлений и эрозивного артрита) и параметрами экспрессии рецепторов к TNF α на субпопуляциях иммунокомпетентных клеток. Выявлены следующие корреляционные взаимосвязи: ревматоидный фактор положительно коррелирует с процентом дубль-позитивных TNFR1⁺TNFR2⁺ клеток среди наивных и Т-клеток памяти как для Т-хелперных, так и для цитотоксических Т-клеток; уровень С-реактивного белка положительно коррелировал с процентом клеток, несущих только рецептор 1 типа, среди всех исследованных субпопуляций Т-лимфоцитов; наличие системных проявлений отрицательно коррелирует с количеством рецепторов как 1, так и 2 типа на наивных Т-хелперных и цитотоксических клетках. Данные показатели могут иметь диагностическое значение для оценки выраженности воспалительного процесса при РА.

Таким образом, профиль ко-экспрессии TNFR1/2 изменяется при РА по сравнению со здоровыми донорами, при этом изменения в параметрах ко-экспрессии ассоциированы с показателями активности ревматоидного артрита.

**CO-EXPRESSION OF RECEPTORS TO THE ALPHA TUMOR
NECROSIS FACTOR ALPHA IN T CELL SUBPOPULATIONS
IN RHEUMATOID ARTHRITIS**

© 2019 A. A. Alshevskaya^{1*}, I. A. Belomestnova¹, J. V. Zhukova¹,
O. A. Chumasova¹, N. S. Shkaruba¹, A. E. Sizikov¹, J. A. Sennikova³,
O. P. Vorobyeva^{1,2}

*E-mail: alkkina@yandex.ru

¹Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology", Novosibirsk, Russia;

²Novosibirsk National Research State University, Novosibirsk, Russia;

³Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russia

Received: 04.03.2019. **Accepted:** 15.03.2019

The tumor necrosis factor alpha (TNF α) play key role as the main pro-inflammatory cytokine in immune processes in rheumatoid arthritis (RA). However, the activity and functions of TNF α can be regulated not only by soluble receptors (which act primarily as neutralizers of action), but also by the amount, density, and co-expression of its membrane-bound receptors type 1 and 2 (TNFR1 and TNFR2). Analysis of the co-expression parameters of TNFR1 and TNFR2 in RA patients compared with healthy donors showed that changes in the amount and co-expression of type 1 and type 2 receptors for TNF-alpha on the surface of immunocompetent cells are associated with indicators of disease activity.

Key words: rheumatoid arthritis, immunoregulatory cytokines, tumor necrosis factor, Tcells, cytokine receptors

Authors:

Alshevskaya A. A., ✉ PhD, Researcher, Laboratory of Molecular Immunology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology (RIFCI), Novosibirsk, Russia. **E-mail:** alkkina@yandex.ru;

Belomestnova I. A., PhD student, Laboratory of Molecular Immunology, RIFCI, Novosibirsk, Russia;

Zhukova J. V., PhD student, Laboratory of Molecular Immunology, RIFCI, Novosibirsk, Russia;

Chumasova O. A., PhD, rheumatologist, Rheumatology Department, Clinic of Immunopathology, RIFCI, Novosibirsk, Russia;

Shkaruba N. S., PhD, rheumatologist, Rheumatology Department, Clinic of Immunopathology, RIFCI, Novosibirsk, Russia;

Sizikov A. E., PhD, Head of Rheumatology Department, Clinic of Immunopathology, RIFCI, Novosibirsk, Russia;

Sennikova J. A., PhD, Associate Professor, Department of Clinical Immunology, Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russia;

Vorobyeva O. P., PhD, Researcher, Laboratory of Molecular Immunology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russia; Lecturer, Department of Clinical Biochemistry, Institute of Medicine and Psychology V. Zelman, Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia.

ЭФФЕКТЫ ПРОЛИН-БОГАТЫХ ПЕПТИДОВ НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ ЛЕЙКОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА *IN VITRO*

© 2019 г. А. Ю. Артамонов^{1*}, М. С. Сухарева^{1,2}, П. М. Копейкин¹,
А. Н. Сухачев¹, Т. А. Филатенкова¹, Д. С. Орлов¹, О. В. Шамова¹

*E-mail: auartamonov@bk.ru

¹ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт Петербург, Россия;

²Политехнический Университет им. Петра Великого, Санкт Петербург, Россия

Поступила: 15.03.2019. Принята: 28.03.2019

Исследованы эффекты пептидов, имеющих высокое содержание остатка пролина в составе молекулы – пролин-богатых пептидов (ПБП) слюны человека (фрагменты катионного пролин-богатого белка слюны 1 (Basic salivary proline-rich protein 1) – P-H (37–51), P-F (43–61), IB6 (98–116), p1932, а также ряда ПБП нейтрофилов животных (бактенецины ChVac3.4, ChVac5, mini-ChVac7.5Nα), на клетки, участвующие в функционировании иммунной системы. Показано, что в присутствии почти всех исследованных ПБП снижается интенсивность дыхательного взрыва фагоцитов крови человека *in vitro*, инициированного введением *Escherichia coli* (эффект более выражен для ПБП слюны). Установлено, что при инкубации пептидов с мононуклеарами периферической крови человека, стимулированными липополисахаридом, наблюдается угнетение высвобождения цитокинов ИЛ-1β, ФНОα при введении в культуральную среду пептидов ChVac3.4, mini-ChVac7.5Nα, p1932, при неизменном уровне ИЛ-10 (для остальных ПБП эффект не выявлен). Таким образом, получены результаты, подтверждающие противовоспалительное действие ПБП и позволяющие предположить, что катионные пролин-богатые белки и пептиды слюны, могут участвовать в регуляции воспалительных процессов в ротовой полости.

Ключевые слова: пролин-богатые пептиды, слюна, противовоспалительная активность, дыхательный взрыв

DOI: 10.31857/S102872210006763-4

Адрес: 197376, ул. Академика Павлова, д. 12, ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Отдел общей патологии и патофизиологии, Артамонов Александр Юрьевич. Тел./факс: +7(812)2340764

E-mail: auartamonov@bk.ru

Авторы:

Артамонов А. Ю., к.б.н., научный сотрудник Отдела общей патологии и патофизиологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины» (ФГБНУ «ИЭМ»), Санкт-Петербург, Россия;

Сухарева М. С., лаборант-исследователь Отдела общей патологии и патофизиологии ФГБНУ «ИЭМ», студент магистратуры Политехнического университета им. Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия;

Копейкин П. М., младший научный сотрудник Отдела общей патологии и патофизиологии ФГБНУ «ИЭМ», Санкт-Петербург, Россия;

Сухачев А. Н. к.б.н., научный сотрудник Отдела иммунологии ФГБНУ «ИЭМ», Санкт-Петербург, Россия;

Филатенкова Т. А., научный сотрудник Отдела общей патологии и патофизиологии ФГБНУ «ИЭМ», Санкт-Петербург, Россия;

Орлов Д. С., к.м.н., заведующий лабораторией иммунопатофизиологии Отдела общей патологии и патофизиологии ФГБНУ «ИЭМ»;

Шамова О. В., д.б.н., заведующий Отделом общей патологии и патофизиологии ФГБНУ «ИЭМ», Санкт-Петербург, Россия.

Пролин-богатые пептиды (ПБП) содержатся в фагоцитирующих клетках некоторых видов животных и играют важную роль в функционировании системы врожденного иммунитета, проявляя выраженную антимикробную активность, а некоторые, также и ранозаживляющее, иммуномодулирующее действие. В нейтрофилах человека ПБП не выявлены, но известно, что такие пролин-богатые белки и пептиды составляют одну из основных белковых фракций слюны человека, содержатся и в других биологических жидкостях, однако биологическая

значимость этих ПБП остается выясненной не до конца. Известно, что ПБП слюны связывают танины, но их роль в обеспечении защитных функций мало изучена [1]. Однако можно предположить, что эти пептиды могут модулировать свойства клеток, участвующих в функционировании иммунной системы.

Целью данной работы явилось изучение эффектов ПБП слюны человека (фрагментов катионного пролин-богатого белка слюны 1 (Basic salivary proline-rich protein 1) – P-H (37–51), P-F (41–63), IB6 (98–116), p1932), а также ряда ПБП нейтрофилов домашней козы *Capra hircus* (бактерицинов ChVac3.4, ChVac5, mini-ChVac7.5N α) на функциональную активность лейкоцитов крови человека (интенсивность дыхательного взрыва фагоцитов, инициированного внесением *E. coli*, а также выделение цитокинов мононуклеарами периферической крови (МКПК), стимулированными липополисахаридом (ЛПС).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Использованные в работе пептиды были получены с помощью твердофазного химического синтеза с применением Fmoc/tBu-стратегии [2] в автоматическом пептидном синтезаторе Symphony X (Protein Technologies, США). Мононуклеары периферической крови человека получали из крови здоровых доноров по стандартной методике. Оценку влияния пептидов на интенсивность респираторного взрыва в ответ на стимуляцию клеток крови микроорганизмом *E. coli in vitro* осуществляли с использованием набора FagoFlowEx (EXBIO, Чехия) методом проточной цитометрии. При поглощении бактерий фагоцитом активируется NADPH оксидаза, что ведет к продукции активных форм кислорода, детектируемых с помощью дигидрорадамина 123. В гепаринизированную кровь (50 мкл) вносили по 10 мкл суспензии *E. coli* и 5 мкл пептидов или 5 мкл среды в контрольных пробах, инкубировали в течение 30 минут при 37 °С. Дополнительные контроли: положительный – стимуляция форбол 12-миристаном 13-ацетатом, отрицательный – кровь без добавления бактерии. После инкубации осуществляли лизис эритроцитов и проводили анализ на проточном цитометре Navios (Beckman Coulter, США). Для анализа эффектов ПБП на выброс цитокинов МКПК человека клетки инкубировали с пептидами, взятыми в разных концентрациях, в присутствии или в отсутствие ЛПС 20 ч при 37 °С и 5%

CO₂. После осаждения клеток уровень цитокинов ИЛ-1, ФНО и ИЛ-10 в супернатанте определяли с помощью наборов для ИФА (ООО Цитокин, Россия).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В присутствии исследованных катионных ПБП слюны (P-H (37–51), P-F(43–61), IB6 (98–116) и p1932) существенно снижается интенсивность дыхательного взрыва фагоцитов крови человека *in vitro*, стимулированных введением *Escherichia coli*. При использовании их в концентрации 5 мкМ – на 36–53%, в концентрации 10 мкМ – на 26–37% ($p < 0.05$ по сравнению с контролем – клетки с бактерией, без пептидов, U-критерий Манна-Уитни). Бактерицины в концентрации 1 и 5 мкМ не оказывали выраженного эффекта, но в концентрации 10 мкМ ChVac3.4 и ChVac 5 подавляли реакцию респираторного взрыва фагоцитов крови человека. Пептид mini-ChVac7.5N подобным действием в концентрации 1, 5 и 10 мкМ не обладал. По данным литературы, ПБП нейтрофилов свиньи – PR-39 обладает противовоспалительным эффектом – этот пептид имеет в составе молекулы последовательности, связывающиеся с рядом пролин-распознающих участков, присутствующих в SH3 (Src homology 3), WW, GYF, EVH1 и др. доменах, что определяет его взаимодействие с различными белками и опосредует регуляторное действие пептида. В частности, PR-39 связывается с SH3 доменом p47phox субъединицы NADPH оксидазы в нейтрофилах, что приводит к ингибированию сборки каталитически активного фермента, в результате чего блокируется продукция супероксидного аниона [3]. Можно предположить, что исследуемые нами ПБП, в состав молекул которых тоже входят такие последовательности, имеют сходный механизм действия. При инкубации пептидов с МКПК человека, стимулированными липополисахаридом, наблюдалось угнетение высвобождения цитокинов ИЛ-1 β , ФНО α при введении в культуральную среду пептидов ChVac3.4, mini-ChVac7.5N α и p1932: при введении ChVac3.4 (1 мкМ и 5 мкМ) уровень ФНО α снижался в 1.5 и 1.2 раза, соответственно, mini-ChVac7.5N α – в 2 раза (1 и 5 мкМ пептида), p1932 (20 мкМ) – в 1.2 раза; уровень ИЛ-1 β уменьшался в 1.5–2 раза при использовании ChVac3.4, mini-ChVac7.5N α (5 мкМ) или p1932 (20 мкМ); $p < 0.05$ по сравнению с МКПК, стимулированными ЛПС без пептидов; при не-

изменном уровне ИЛ10 (для остальных ПБП эффект не выявлен).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Получены результаты, подтверждающие противовоспалительное действие ПБП и позволяющие предположить, что катионные пролин-богатые белки и пептиды слюны, могут участвовать в регуляции воспалительных процессов в ротовой полости.

Работа поддержана грантом РФФИ № 17–04–02177а.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. *Вавилова Т. П., Янушев О. О., Островская И. Г.* Слюна. Аналитические возможности и перспективы. М.: Издательство БИНОМ. 2014. 312 с.
2. *Merrifield R. B., Barany G.* Solid-phase peptide synthesis. In: *The peptides: analysis, synthesis, biology*. 1980, New York: Academic Press, No 2, P. 3–284.
3. *Shi J., Ross C.R., Leto T.L., Blecha F.* PR-39, a proline-rich antibacterial peptide that inhibits phagocyte NADPH oxidase activity by binding to Src homology 3 domains of p47 phox. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996; 93(12), 6014–8.

EFFECTS OF PROLINE-RICH PEPTIDES ON THE FUNCTIONAL ACTIVITY OF HUMAN LEUKOCYTES *IN VITRO*

© 2019 A. Yu. Artamonov^{1*}, M. S. Sukhareva^{1,2}, P. M. Kopeykin¹, A. N. Sukhachev¹, T. A. Filatenkova¹, D. S. Orlov¹, O. V. Shamova¹

*E-mail: auartamonov@bk.ru

¹FSBSI Institute of Experimental Medicine, St-Petersburg, Russia;

²Peter the Great Polytechnic University, St-Petersburg, Russia;

Received: 15.03.2019. Accepted: 28.03.2019

The effects of peptides with a high content of proline (Proline-Rich Peptides, PRPs) of human saliva (fragments of Basic salivary proline-rich protein 1 – P-H (37–51), P-F (43–61), IB6 (98–116), p1932), as well as of several animal's neutrophilic PRPs (bactenecins ChBac3.4, ChBac5, mini-ChBac7.5Na), towards cells involved in the functioning of the immune system have been explored. In the presence of each of the investigated PRPs the intensity of the respiratory burst of human blood phagocytes *in vitro*, challenged by *Escherichia coli*, was reduced (the effect was more pronounced in the case of salivary PRPs). Administration of ChBac3.4, mini-ChBac7.5Na, p1932 to human peripheral blood mononuclear cells, stimulated with lipopolysaccharide, caused a decrease of LPS-mediated release of cytokines IL1 β , TNF α , without affecting a level of IL10 (for other PRPs the effects were not significant). Thus, the results confirm the anti-inflammatory action of PRPs and point to the suggestion that cationic proline-rich proteins and peptides of saliva may be involved in regulation of inflammation in the oral cavity.

Key words: proline-rich peptides, saliva, anti-inflammatory activity, respiratory burst

Authors:

Artamonov A. Yu., ✉ PhD, Research Scientist of the Department of General Pathology and Pathophysiology, Institute for Experimental Medicine (IEM), Saint-Petersburg, Russia. E-mail: auartamonov@bk.ru;

Sukhareva M. S., Technician of the Department of General Pathology and Pathophysiology, IEM; Student of Peter the Great Polytechnic University, Saint-Petersburg, Russia;

Kopeykin P. M., Junior Research Scientist of the Department of General Pathology and Pathophysiology, IEM, Saint-Petersburg, Russia;

Sukhachev A. N., PhD, Research Scientist of the Department of Immunology, IEM, Saint-Petersburg, Russia;

Filatenkova T. A., Research Scientist of the Department of General Pathology and Pathophysiology, IEM, Saint-Petersburg, Russia;

Orlov D. S., PhD, Head of the Laboratory of Immunopathophysiology of the Department of General Pathology and Pathophysiology, IEM, Saint-Petersburg, Russia;

Shamova O. V., PhD, Dr. of Sci, Head of the Department of General Pathology and Pathophysiology, IEM, Saint-Petersburg, Russia.

МЫШИ С НОКАУТОМ ГЕНА *Muc2* – МОДЕЛЬ ДЛЯ ОЦЕНКИ СПОСОБОВ ВОЗДЕЙСТВИЯ НА МИКРОФЛОРУ КИШЕЧНИКА

© 2019 г. К. М. Ачасова^{1,2*}, Е. А. Литвинова^{2,1}

*E-mail: achasovaks@mail.ru

¹ФГБУН «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН», Новосибирск, Россия;

²ФГБУН «Сибирский федеральный научный центр агробиотехнологий РАН», Новосибирск, Россия

Поступила: 27.02.2019. Принята: 11.03.2019

В кишечнике обитает огромное количество бактерий, взаимодействующих с иммунной системой хозяина. Нарушение гомеостаза в кишечнике приводит к различным патологическим состояниям, которые необходимо корректировать путем воздействия на микрофлору. В работе представлены данные о влиянии изменения кишечной микрофлоры на жизнеспособность мышей с нарушенной барьерной функцией (*Muc2*^{-/-}). Выявленная чувствительность *Muc2*^{-/-}-мышей к изменению микрофлоры позволяет предложить данную линию в качестве хорошей модели для тестирования различных способов воздействия на микрофлору.

Ключевые слова: микрофлора, антибиотики, пробиотики, пребиотики, барьерная функция кишечника, мукозальный иммунитет

DOI: 10.31857/S102872210006753-3

Адрес: 630090, Новосибирск, Россия, пр. ак. Лаврентьева, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» (ИЦиГ СО РАН), лаборатория генетики лабораторных животных, Ачасова Ксения Михайловна.

Тел.: 8 923 126 69 33

E-mail: achasovaks@mail.ru

Авторы:

Ачасова К. М., аспирант лаборатории генетики лабораторных животных, ФГБУН «ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН», Новосибирск, Россия; м.н.с. лаборатории регуляции микробиоценозов сельскохозяйственных животных и растений, ФГБУН «Сибирский федеральный научный центр агробиотехнологий РАН», Новосибирск, Россия;

Литвинова Е. А., в.н.с. лаборатории регуляции микробиоценозов сельскохозяйственных животных и растений, ФГБУН «Сибирский федеральный научный центр агробиотехнологий РАН», Новосибирск, Россия; с.н.с. лаборатории генетики лабораторных животных, ФГБУН «ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН», Новосибирск, Россия.

В здоровом кишечнике животных обитает огромное количество бактерий, которые находятся в просвете и практически не взаимодействуют с эпителиальными клетками благодаря специальному мукусному барьеру. При этом

бактерии модулируют иммунную систему кишечника хозяина, что с одной стороны препятствует развитию сильной иммунной реакции на антигены симбиотической микрофлоры, а с другой, обеспечивает быстрый иммунный ответ при появлении патогенных бактерий [1].

Нарушение гомеостаза в кишечнике, например, в результате нарушения микрофлоры, может приводить к различным патологическим состояниям, в том числе к воспалительным заболеваниям кишечника (ВЗК). Нарушение микрофлоры может происходить из-за воздействия на нее различных факторов (питание, прием антибиотиков для борьбы с инфекциями). В связи с этим, поддержание и корректирование кишечной микрофлоры при помощи антибиотиков, а также пре- и пробиотиков становится актуальной задачей в медицине, ведется активная разработка новых способов воздействия на микрофлору. При этом, в медицинской практике необходимо корректировать кишечную микрофлору как у здоровых людей, так и у пациентов с различными патологиями. В связи с этим, необходим поиск хороших экспериментальных

моделей для разработки и тестирования новых методов воздействия на кишечную микрофлору, а также оценка их безопасности для здоровья.

В данной работе в качестве потенциальной модели использовали мышей с нокаутом гена *Muc2* (*Muc2*^{-/-}) – модель с предрасположенностью к ВЗК. У *Muc2*^{-/-}-мышей нарушен синтез муцина-2, составляющего основу мукусного барьера в кишечнике, вследствие этого кишечные бактерии вступают в прямой контакт с эпителиальными клетками [2]. В качестве модели с нормальной барьерной функцией кишечника использовали мышей линии C57BL/6. Все манипуляции с животными были одобрены межведомственной комиссией по биоэтике СО РАН (протокол № 28, выдан 19.06.2015). В исследовании использовали мышей C57BL/6, свободных от специфических патогенов (расширенный список FELASA 2014), и *Muc2*^{-/-} мышей, положительных на инфекцию *Helicobacter spp.* Влияние дефицита муцина-2 на иммунные показатели исследовали на мышах в возрасте 8–10 недель, проводили гистологический анализ толстой кишки, анализ количества цитокинов и иммуноглобулинов в толстой кишке, а также количество IgG против собственной микрофлоры в крови. Затем мышам в возрасте 8–10 недель в течение двух недель предоставляли смесь антибиотиков широкого спектра действия (кларитромицин, амоксицилин, метронидазол) и оценивали общее состояние, вес животных, а также изменение кишечной микрофлоры.

На гистологических срезах восходящего отдела толстой кишки не было выявлено признаков острого воспаления таких как отек, эрозия эпителия и лейкоцитарные инфильтраты, ни у мышей *Muc2*^{-/-}, ни у мышей C57BL/6. Однако, у мышей *Muc2*^{-/-} была отмечена гиперплазия крипт, а также было обнаружено, что у *Muc2*^{-/-} мышей в ткани толстой кишки больше макрофагов, чем у C57BL/6. При этом количество провоспалительных цитокинов в толстой кишке у мутантных мышей не отличалось от C57BL/6. Таким образом, несмотря на тесный контакт с микрофлорой, содержащей инфекционный агент *Helicobacter spp.*, мыши с дефицитом муцина-2 не демонстрируют острого воспаления в кишечнике, однако, выявляются некоторые признаки хронического воспаления.

Анализ иммуноглобулинов показал, что у *Muc2*^{-/-} мышей больше IgG в толстой кишке по сравнению с C57BL/6. Помимо этого, в крови у *Muc2*^{-/-} мышей было обнаружено больше

IgG против собственной кишечной микрофлоры, чем у C57BL/6. Количество IgA в толстой кишке у мышей не отличалось. Таким образом, тесный контакт иммунной системы с симбиотической микрофлорой и инфекцией *Helicobacter spp.*, обусловленный нарушением барьера в кишечнике, приводит к активации специфического иммунитета и формированию адаптации иммунной системы для предотвращения острого воспаления против микрофлоры.

В результате приема антибиотиков, у мышей *Muc2*^{-/-} и C57BL/6 наблюдалось снижение количества бактерий в кишечнике, а также обеднение видового разнообразия. Нарушение микрофлоры сочеталось с негативными эффектами на состояние мышей. На 6 день предоставления антибиотиков масса тела мышей снижалась на 10–15%. На 10 день эксперимента масса тела C57BL/6 восстанавливалась до 100% от первоначальной. У *Muc2*^{-/-} мышей, наоборот, масса тела снижалась до 75–85%. Также у *Muc2*^{-/-} мышей наблюдалось ухудшение состояния, которое выражалось в снижении двигательной активности и появлении ректальных кровотечений. Через 14 дней приема антибиотиков, 35.7% *Muc2*^{-/-} мышей погибали (5 из 14 мышей), а среди C57BL/6 выживали 100% животных (8 из 8 мышей).

Результаты исследования демонстрируют, что при наличии тесного контакта с симбиотическими бактериями и инфекционным агентом *Helicobacter spp.* в условиях нарушения барьерной функции кишечника, у мышей развиваются адаптации иммунной системы. При нарушении сформировавшегося устойчивого состояния путем нарушения микрофлоры кишечника антибиотиками, наблюдаются негативные последствия для общего состояния организма, включая гибель животных. Таким образом, мыши *Muc2*^{-/-} могут выступать в качестве модели, чувствительной к воздействию на микрофлору. Данная модель может быть полезной для разработки и тестирования различных методов воздействия на кишечную микрофлору.

Исследование поддержано бюджетным проектом № 0533-2019-0003, расходные материалы приобретены за счет гранта РФФИ 18-015-00329. Исследование выполнено с использованием оборудования ЦКП «Центр генетических ресурсов лабораторных животных» ФИЦ ИЦиГ СО РАН (уникальный идентификатор проекта RFMEFI62117X0015).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Artis D. Epithelial-cell recognition of commensal bacteria and maintenance of immune homeostasis in the gut. // *Nat Rev Immunol.*— 2008.— V. 8.— N. 6.— P. 411–420. doi: 10.1038/nri2316.
2. Johansson M. E., Phillipson M., Petersson J., Velcich A., Holm L., Hansson G. C. The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. // *Proc Natl Acad Sci USA.*— 2008.— V. 105.— N. 39.— P. 15064–15069. doi: 10.1073/pnas.0803124105.

***Muc2* KNOCKOUT MICE AS A MODEL FOR TESTING APPROACHES TO ALTER GUT MICROBIOTA**

© 2019 K. M. Achasova^{1,2*}, E. A. Litvinova^{2,1}

*E-mail: achasovaks@mail.ru

¹The Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia;

²Siberian Federal Scientific Centre of Agro-BioTechnologies of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

Received: 27.02.2019. **Accepted:** 11.03.2019

Gut is inhabited by numerous of bacteria interacting with the immune system of the host. Disturbance of the gut homeostasis leads to various pathological states, which are to be treated by changing of microbiota. The study demonstrate the effects of microbiota alteration on viability of mice with deficient barrier function in the gut (*Muc2*^{-/-}). The susceptibility of *Muc2*^{-/-} mice to changing of microbiota suggesting the mice as an appropriate model for testing approaches to alter gut microbiota.

Key words: microbiota, antibiotics, probiotics, prebiotics, gut barrier function, mucosal immunity

Authors:

Achasova K. M., ✉ PhD student in the laboratory of genetics of laboratory animals, The Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics SBRAS, Novosibirsk; junior researcher in the laboratory for regulation of agricultural animals and plants microbiocenosis, Siberian Federal Scientific Centre of Agro-BioTechnologies RAS, Novosibirsk, Russia. **E-mail:** achasovaks@mail.ru;
Litvinova E. A., leading researcher in the laboratory for regulation of agricultural animals and plants microbiocenosis, Siberian Federal Scientific Centre of Agro-BioTechnologies RAS, Novosibirsk; senior researcher in the laboratory of genetics of laboratory animals, The Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics, SBRAS, Novosibirsk, Russia.

АКТИВАЦИЯ ТРАНСКРИПЦИИ ГЕНОВ СИСТЕМЫ ИНТЕРФЕРОНА ПОД ВЛИЯНИЕМ ДРОЖЖЕВОЙ ДУСПИРАЛЬНОЙ РНК

2019 г. А. В. Батенева*, С. Г. Гамалей, Л. Р. Лебедев,
Е. Д. Даниленко

*E-mail: bateneva_av@vector.nsc.ru

ИМБТ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Бердск,
Новосибирская область, Россия

Поступила: 12.03.2019. Принята: 25.03.2019

В экспериментах на мышах исследован уровень экспрессии белков, опосредующих противовирусный ответ, в перитонеальных макрофагах в ответ на внутрибрюшинное введение дуспиральной РНК (дсРНК) из дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Изучена дозовая (0,5 и 1,5 мг/кг) и временная (5 и 24 ч) зависимость влияния дсРНК на активность генов, кодирующих рецептор TLR3, ИФН-альфа, ИФН-бета, 2',5'-олигоденилатсинтетазу (OAS) и протеинкиназу R. Полученные результаты свидетельствуют о повышении в клетках уровня транскрипционной активности, наиболее выраженном в отношении генов TLR3, ИФН-альфа и OAS. Максимальный эффект был отмечен при введении дсРНК в эффективной противовирусной дозе (0,5 мг/кг) через 5 часов после введения.

Ключевые слова: дсРНК, TLR3, ИФН-альфа, ИФН-бета, 2',5'-олигоденилатсинтетаза, протеинкиназа R, экспрессия генов, перитонеальные макрофаги, мыши

DOI: 10.31857/S102872210006752-2

Адрес: 633010, г. Бердск-10 Новосибирской области, ул. Хим-заводская, 9, а/я 112, Батенева А. В.

Телефон: (383) 363-80-14. Факс: (383) 363-80-16.

E-mail: kanz_imbt@vector.nsc.ru

Авторы:

Батенева А. В., научный сотрудник отдела биологических исследований ИМБТ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Бердск, Новосибирская область, Россия;

Гамалей С. Г., зав. отделом биологических исследований ИМБТ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Бердск, Новосибирская область, Россия;

Лебедев Л. Р., д.б.н., зав. лабораторией нуклеиновых кислот и рекомбинантных белков ИМБТ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Бердск, Новосибирская область, Россия;

Даниленко Е. Д., к.б.н., директор ИМБТ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Бердск, Новосибирская область, Россия.

ВВЕДЕНИЕ

Как известно, система интерферона (ИФН) является важнейшей составляющей врожденного иммунитета. Среди веществ – стимуляторов данной системы широко известны дуспиральные РНК (дсРНК), способные вызывать индукцию ИФН 1 типа и активировать ИФН-зависимые ферменты, участвующие в реализации противовирусной реакции. Ключевыми ферментами,

подавляющими репликацию вирусов в клетках, являются 2',5'-олигоденилатсинтетаза (OAS), РНКазы L и протеинкиназа R (PKR). Изучению механизмов противовирусного действия дсРНК посвящено значительное количество работ, однако эти исследования ограничены преимущественно системами *in vitro* [1]. Поэтому изучение особенностей внутриклеточного действия природных дсРНК после их введения в живой организм по-прежнему остается актуальной задачей.

Природная дсРНК, выделенная из киллерного штамма дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, является одним из активных компонентов отечественного препарата Ридостин (патент РФ № 2083221). В процессе доклинических и клинических исследований было показано, что Ридостин стимулирует выработку эндогенного ИФН разных типов, повышает клеточный иммунитет, подавляет репродукцию вирусов и развитие внутриклеточных микроорганизмов. Установлено, что препарат дсРНК способен усиливать фагоцитарную, метаболическую и бактерицидную активность перитонеальных макрофагов [2]. Макрофаги, как известно, экспрессируют разные типы сигнальных рецепторов, в том числе

Toll-like рецептор 3 типа (TLR3), являющийся специфическим рецептором дсРНК [3]. Связывание дсРНК с TLR3 приводит к активации сигнальных путей и индукции транскрипции генов ИФН и воспалительных цитокинов [4]. В связи с этим, макрофаги являются интересным объектом для изучения особенностей развития внутриклеточной противовирусной реакции под действием дсРНК.

Цель исследования — изучение влияния дрожжевой дсРНК на экспрессию генов рецептора TLR3 и противовирусных белков ИФН-альфа, ИФН-бета, OAS, PKR в перитонеальных макрофагах мышей после внутрибрюшинного введения препарата.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В эксперименте использовали препарат дсРНК (мол. вес 5800–7400 п.н.) с чистотой 93%, полученный из натриевой соли двуспиральной рибонуклеиновой кислоты, субстанции Ридостина (ООО «Диафарм», г. Бердск Новосибирской области). Исследования проводили на самцах мышей линии Balb/c.

Раствор дсРНК вводили внутрибрюшинно однократно в дозах 0,5 и 1,5 мг/кг, что соответствует эффективной противовирусной дозе препарата Ридостина дозе, превышающей ее в три раза (в пересчете на дсРНК). Животным контрольной группы вводили растворитель физиологический раствор. Через 5 и 24 ч после введения препарата забирали перитонеальный экссудат для получения культуры макрофагов. Клетки культивировали в среде RPMI-1640, содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки и 0,004% гентамицина, при 37 °С и 5% CO₂ в течение 2 ч. После получения монослоя макрофагов клетки подсчитывали, лизировали и выделяли суммарную РНК. Содержание РНК и чистоту полученных образцов определяли спектрофотометрически. Оценку уровня экспрессии дсРНК-активируемых генов TLR3, ИФН-альфа, ИФН-бета, OAS и PKR проводили методом ПЦР в реальном времени. Последовательность специфических праймеров была выбрана из Банка праймеров Гарвардского университета (<http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/index.html>), синтез осуществлен ЗАО «Синтол». Специфичность и размер продуктов реакции определяли по кривой плавления и электрофорезом в агарозном геле. Уровень относительной экспрессии генов оценивали методом ΔCt .

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование показало, что препарат дсРНК усиливал экспрессию генов TLR3, ИФН-альфа, ИФН-бета и OAS в перитонеальных макрофагах мышей. Наиболее выраженное повышение транскрипционной активности было отмечено через 5 часов после введения. Препарат дсРНК в дозе 0,5 мг/кг в этот срок более активно повышал уровень транскрипции генов TLR3 (в 27 раз, по отношению к контролю), ИФН-альфа (в 70 раз), OAS (в 43 раза) и умеренно — ИФН-бета (в 9,2 раза). Активирующий эффект препарата в дозе 1,5 мг/кг был более слабым, чем в дозе 0,5 мг/кг. Кратность стимуляции транскрипции генов после введения большей дозы дсРНК составляла: для TLR3 — 13 раз, ИФН-альфа — 21 раз, OAS — 10,6 раза, ИФН-бета — 5,8 раза. То есть, в данном случае наблюдался эффект обратной дозовой зависимости генной индукции, характерный для индукторов интерферона. Как известно, для каждого индуктора существует определенный диапазон доз для осуществления максимальной ИФН-индуцирующей активности. Увеличение или уменьшение дозы приводит к снижению синтеза ИФН.

К концу первых суток после введения дсРНК эффект стимуляции заметно снижался в обеих опытных группах, однако в случае введения препарата в дозе 1,5 мг/кг — в меньшей степени. Более высокими в этот период были показатели синтеза мРНК OAS (увеличение в 6,7 и 9,7 раза, соответственно, для дозы 0,5 и 1,5 мг/кг), TLR3 (в 3,7 и 5,1 раза) и ИФН-бета (в 2,7 и 7,7 раза). Уровень транскрипции гена ИФН-альфа через сутки после введения не отличался от контрольного.

Динамика изменения транскрипции гена PKR значительно отличалась от описанной выше для других генов. Признаков активации гена PKR через 5 ч после введения дсРНК в дозе 0,5 мг/кг не обнаружено, а трехкратная доза подавляла экспрессию гена, по сравнению с контролем, в 6,7 раза. Активность гена PKR незначительно возрастала только через сутки после введения дсРНК, и в этой временной точке превышала контрольный уровень в 1,9 и 2,5 раза для дозы 0,5 и 1,5 мг/кг, соответственно. Как известно, индукция ИФН-зависимых белков существенным образом зависит от природы клеток, концентрации дсРНК, типа секретируемого ИФН. Так, авторы работы [5] показали, что ферментативная активность PKR проявляется исключительно при низкой концентрации дсРНК (10^{-7} – 10^{-9} г/мл),

и наоборот, OAS максимально активна при высокой концентрации (10^{-5} г/мл и выше). В условиях данного эксперимента доза препарата при внутрибрюшинном введении составляла 1 и 3×10^{-5} г на животное, что, вероятно, и повлияло на динамику индукции генов OAS и PKR.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что дсРНК дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* вызывает активацию генов рецептора TLR3, ИФН первого типа и фермента OAS в перитонеальных макрофагах мышей. Динамика эффекта носит дозозависимый характер: препарат в эффективной противовирусной дозе оказывает более выраженный активирующий эффект в первые часы после введения, в то время как трехкратная доза оказывает более длительное активирующее действие на транскрипцию генов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Zhang Sh., Herman M., Ciancanelli M., Diego R., Sanchi-Shimizu V., Abel L., Casanova J. TLR3 immunity to infection in mice and humans. *Current Opinion in Immunology*. 2013, 25, 19–33.
2. Даниленко Е.Д., Сысоева Г.М., Рослякова Е.Ю., Аликин Ю.С., Масычева В.И. Влияние L- и M-форм двуспиральных РНК из дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* на функцию фагоцитов. Вестник Уральской медицинской академической науки. 2010, 4(32), 39–42. [Danilenko E. D., Sysoeva G. M., Roslyakova E. Yu., Alikin Yu. S., Masycheva V. I. Effect of L- and M-forms of double-stranded RNA from yeast *Saccharomyces cerevisiae* on the function of phagocytes. *Bulletin of the Ural Medical Academic Science*. 2010, 4(32), 39–42].
3. Applequist S. E., Wallin R., Ljunggren H.-G. Variable expression of Toll-like receptor in murine innate and adaptive immune cell lines. *International Immunology*. 2002, 14(9), 1065–1074.
4. Соколова Т.М. Иммунное узнавание вирусных нуклеиновых кислот приводит к индукции интерферонов и воспалительных цитокинов. В сб. науч. статей «Интерферон-2011», М. 2012, 52–63 [Sokolova T. M. Immune recognition of viral nucleic acids leads to the induction of interferons and inflammatory cytokines. In the collection of scientific articles “Interferon-2011”. М. 2012, 52–63].
5. Williams B., Gilbert C., Kerr I. The respective roles of the protein kinase and pppA2' p5' A2' p5' A-activated endonuclease in the inhibition of protein synthesis by double stranded RNA in rabbit reticulocyte lysates. *Nucleic Acids Research*. 1979, 6(4), 1335–1350.

ACTIVATION OF INTERFERON SYSTEM GENE TRANSCRIPTION BY YEAST DOUBLE-STRANDED RNA

© 2019 A. V. Bateneva*, S. G. Gamaley, L. R. Lebedev, E. D. Danilenko

*E-mail: bateneva_av@vector.nsc.ru

Institute of Medical Biotechnology FBRI SRC VB “Vector” Rospotrebnadzor, Berdsk, Novosibirsk Region, Russia

Received: 12.03.2019. Accepted: 25.03.2019

In experiments on mice, the level of expression of antiviral-response-mediating proteins was studied in peritoneal macrophages, in reaction to the intraperitoneal administration of double-stranded RNA (dsRNA) from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Dose (0.5 and 1.5 mg/kg) and time (5 and 24 hours) dependencies of the effect of dsRNA on the activity of genes encoding Toll-like receptor 3 (TLR3), IFN- α , IFN- β , 2',5'-oligoadenylatesynthetase (OAS) and protein kinase R were determined. The obtained results indicate the increase in the level of transcriptional activity in the cells, most pronounced for TLR3, IFN- α and OAS genes. The maximum effect was observed 5 hours after the administration of dsRNA in the effective antiviral dose (0.5 mg / kg).

Key words: dsRNA, TLR3, IFN- α , IFN- β , 2',5'-oligoadenylatesynthetase, protein kinase R, gene expression, peritoneal macrophages, mice

Authors:

Bateneva A. V., ✉ Researcher, Department of Biological Research, Institute of Medical Biotechnology FBRI SRC VB “Vector” Rospotrebnadzor, Berdsk, Novosibirsk Region, Russia. E-mail: bateneva_av@vector.nsc.ru;

Gamaley S. G., Head of Department of Biological Research, Institute of Medical Biotechnology FBRI SRC VB “Vector” Rospotrebnadzor, Berdsk, Novosibirsk Region, Russia;

Lebedev L. R., Dr.habil., Head of the laboratory of Nucleic Acids and Recombinant Proteins, Institute of Medical Biotechnology FBRI SRC VB “Vector” Rospotrebnadzor, Berdsk, Novosibirsk Region, Russia;

Danilenko E. D., Ph.D., director of Institute of Medical Biotechnology FBRI SRC VB “Vector” Rospotrebnadzor, Berdsk, Novosibirsk Region, Russia.

ИССЛЕДОВАНИЕ ФЕНОМЕНА МИГРАЦИИ НЕЙТРОФИЛОВ В ЛИМФАТИЧЕСКИЕ СОСУДЫ В ПРОЦЕССЕ ВОСПАЛЕНИЯ, ИНДУЦИРОВАННОГО УСЛОВНО-ПАТОГЕННЫМ ГРИБОМ *A. FUMIGATUS*

© 2019 г. Е. Л. Болховитина^{1*}, А. С. Федорина^{1,3}, А. О. Богородский²,
А. О. Смирнова^{1,2}, Е. Н. Чурсанова^{1,3}, А. М. Сапожников¹,
В. И. Борщевский², М. А. Шевченко¹

*E-mail: alenkash83@gmail.com

¹ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина
и Ю. А. Овчинникова» РАН, Москва, Россия;

²ФГАОУ ВО «Московский физико-технический институт (национальный
исследовательский университет)», Долгопрудный, Россия;

³ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова»,
Москва, Россия

Поступила: 14.03.2019. Принята: 27.03.2019

Нейтрофилы – основные эффекторные клетки иммунного ответа на экзогенные патогены, в том числе, условно-патогенный грибок *Aspergillus fumigatus*. В очаге воспаления в процессе борьбы с патогеном наблюдают массовую гибель нейтрофилов. Однако в некоторых случаях нейтрофилы выживают и мигрируют в лимфатические сосуды, что имеет значения для окончательной нейтрализации патогена и активации адаптивного иммунного ответа. В данном исследовании была охарактеризована способность нейтрофилов мигрировать в лимфатические сосуды в процессе воспаления, вызванного ингаляцией конидий *A. fumigatus*. В результате были получены новые данные о динамике миграции нейтрофилов в лимфатические сосуды и о роли нейтрофилов в контроле за диссеминацией конидий в организме.

Ключевые слова: нейтрофилы, *Aspergillus fumigatus*, лимфатические сосуды, конфокальная лазерная сканирующая микроскопия

DOI: 10.31857/S102872210006751-1

Адрес: 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10 ФГБУН «Институт биоорганической химии им. акад. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, лаборатория клеточных взаимодействий, Болховитина Елена Леонидовна.

Тел./факс: +7(495) 330 40 11, 8 926 263 15 66 (моб.).

E-mail: alenkash83@gmail.com

Авторы:

Болховитина Е. Л., м.н.с. лаборатории клеточных взаимодействий ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова» РАН, Москва, Россия;

Федорина А. С., студент ФГБОУ ВО Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Москва, Россия;

Богородский О. А., аспирант ФГАОУ ВО «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)», Долгопрудный, Россия;

Смирнова А. О., студент ФГАОУ ВО «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)», Долгопрудный, Россия;

Чурсанова Е. Н., студент ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова», Москва, Россия;

Сапожников А. М., д.б.н., профессор, заведующий лабораторией клеточных взаимодействий ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова» РАН, Москва, Россия;

Борщевский В. И., к.ф.-м.н., с.н.с. Лаборатории перспективных исследований мембранных белков Исследовательского центра механизмов старения и возрастных исследований ФГАОУ ВО «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)», Долгопрудный, Россия;

Шевченко М. А., к.б.н., н.с. лаборатории клеточных взаимодействий ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова» РАН, Москва, Россия.

Нейтрофилы – основные эффекторные клетки иммунного ответа против экзогенных пато-

генов бактериальной и грибной природы, в том числе условно-патогенного гриба *Aspergillus fumigatus* [1]. В очаге воспаления нейтрофилы погибают нетозом, некрозом или апоптозом [2], но иногда выживают и возвращаются в кровоток или проникают в лимфатические сосуды [1, 3]. Выжившие нейтрофилы мигрируют в лимфатические узлы, где нейтрализуют остаточные патогены [1]. При этом в случае *M. bovis*, именно нейтрофилы транспортировали патоген в лимфоузлы [3]. В то же время, *S. aureus* перемещался по лимфе независимо от нейтрофилов, так как последние приходят в дренирующие лимфоузлы по кровеносным сосудам [1].

Механизм, посредством которого конидии *A. fumigatus* преодолевают эпителиальный барьер респираторного тракта и далее распространяются в организме при инфекции, не известен. При этом высеив патогена из стерильных жидкостей организма — крови и лимфы, наблюдают при инвазивном аспергиллезе, что подтверждает проникновение конидий из просвета дыхательных путей через эпителиальные и эндотелиальные барьеры в ткани и сосуды. Ранее мы проводили исследования интернализации конидий нейтрофилами слизистой оболочки главного бронха [4].

Цель настоящего исследования — охарактеризовать способность нейтрофилов проникать в лимфатические сосуды в процессе воспаления, вызванного ингаляцией конидий гриба *A. fumigatus*.

Конидии *A. fumigatus* вводили мышам орофарингеально. Тотальные образцы главного бронха окрашивали антителами крысы против Ly6G мыши (clone 1A8, Biolegend), антителами козы против CD31 мыши (R&D System), и антителами кролика против Lyve-1 мыши (Abcam). Затем набором вторичных антител осы (Invitrogen): против иммуноглобулинов крысы — Alexa488, против иммуноглобулинов козы — Alexa555 и против иммуноглобулинов кролика — Alexa647. Визуализацию проводили при помощи конфокального микроскопа Zeiss LSM 780.

При однократном введении, конидии наблюдали только на стороне эпителия, обращенной в просвет дыхательного пути, но не в стенке бронха и не в подслизистом слое. Окрашивание при помощи антител к Lyve-1 позволило идентифицировать сеть сосудов, представляющую афферентные лимфатические капилляры. Ней-

трофилы определяли по экспрессии Ly6G. Как в острой фазе воспаления, так и в отложенной фазе и на стадии разрешения воспаления были идентифицированы единичные нейтрофилы, ассоциированные с лимфатическими капиллярами. Нейтрофилы находились на стороне эндотелия, обращенной во внутреннюю полость в непосредственной близости от эндотелиальных клеток, а в некоторых случаях в стенках капилляров. В острой фазе воспаления наблюдалась массовая миграция нейтрофилов по кровеносным сосудам, экспрессирующим CD31, но не Lyve-1. На стадии разрешения воспаления таких событий практически не наблюдалось.

Использование полученного в данном исследовании метода единовременной визуализации нейтрофилов, конидий, лимфатических и кровеносных сосудов позволит определить роль миграции нейтрофилов по лимфатическим сосудам в развитии терминации воспалительных процессов.

Таким образом, в данной работе было показано, что при разовой ингаляции иммунокомпетентным мышам спор условно-патогенного гриба *A. fumigatus*, наблюдается миграция нейтрофилов в ассоциированные с дыхательными путями лимфатические капилляры.

Поддержано РФФИ, проект № 18-315-00166; участие В. И. Борщевского поддержано Минобрнауки России, проект № 6.9909.2017/6.7.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Bogoslawski A., Butcher E. C., Kubes P. Neutrophils recruited through high endothelial venules of the lymph nodes via PNA^d intercept disseminating *Staphylococcus aureus*. Proc Natl Acad Sci USA. 2018;115(10):2449–2454.
2. Lu T., Kobayashi S. D., Quinn M. T., Deleo F. R. A NET Outcome. Front Immunol. 2012 Dec 5;3:365.
3. Abadie V., Badell E., Douillard P., Ensergueix D., Leenen P. J., Tanguy M., Fiette L., Saeland S., Gicquel B., Winter N. Neutrophils rapidly migrate via lymphatics after *Mycobacterium bovis* BCG intradermal vaccination and shuttle live bacilli to the draining lymph nodes. Blood. 2005 Sep 1;106(5):1843–50.
4. Shevchenko M. A., Bogorodskiy A. O., Troyanova N. I., Servuli E. A., Bolkhovitina E. L., Büldt G., Fahlke C., Gordeliy V. I., Gensch T., Borschhevskiy V. I., Sapozhnikov A. M. *Aspergillus fumigatus* Infection-Induced Neutrophil Recruitment and Location in the Conducting Airway of Immunocompetent, Neutropenic, and Immunosuppressed Mice. J Immunol Res. 2018 Jan 18; 2018:5379085.

INVESTIGATION OF NEUTROPHIL MIGRATION VIA LYMPHATIC VESSELS
IN THE COURSE OF *A. FUMIGATUS*-INDUCED INFLAMMATION

© 2019 E. L. Bolkhovitina^{1*}, A. S. Fedorina^{1,3}, A. O. Bogorodskiy²,
A. O. Smirnova^{1,2}, E. N. Chursanova^{1,3}, A. M. Sapozhnikov¹,
V. I. Borshchevskiy², M. A. Shevchenko¹

*E-mail: alenkash83@gmail.com

¹Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia;

²Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia;

³Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprugniy, Russia

Received: 14.03.2019. Accepted: 27.03.2019

Neutrophils are the main effector cells that are mediated immune response to exogenous pathogens including opportunistic fungi *Aspergillus fumigatus*. Neutrophils infiltrate inflamed tissues and massively die during the fight against pathogen. However, in some cases neutrophils survive and migrate to lymphatic vessels to neutralize residual pathogens and activate adaptive immune response. In the present study we characterized the ability of neutrophils to migrate via lymphatic vessels during *A. fumigatus* conidia-induced inflammation. As a result, new data about neutrophils migration kinetics to lymphatic vessels and the role of neutrophils in control of fungal spore dissemination in the host organism were obtained.

Key words: neutrophils, lymphatic vessels, APC, *Aspergillus fumigatus*, airway inflammation

Authors:

Bolkhovitina E. L., ✉ JRF Laboratory of Cell Interactions, Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia. E-mail: alenkash83@gmail.com;

Fedorina A. S., Student of Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia;

Bogorodskiy O. A., PhD student of Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprugniy, Russia;

Smirnova A. O., Student of Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprugniy, Russia;

Chursanova E. N., Student of Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia;

Sapozhnikov A. M., Professor, Head of the Laboratory of Cell Interactions, Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia;

Borshchevskiy V. I., PhD, SRF, Laboratory for Advanced Studies of Membrane Proteins, Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprugniy, Russia;

Shevchenko M. A., PhD, RF, Laboratory of Cell Interactions, Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia.

АНАЛИЗ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА ЧЕЛОВЕКА TIM-1 МЕТОДОМ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ

© 2019 г Т. Ю. Бондаренко*, В. А. Святченко, В. А. Терновой

*E-mail: lemtat@ngs.ru

ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово,
Новосибирская область, Россия

Поступила: 14.03.2019. Принята: 29.03.2019

Уровень экспрессии гена человека Т-клеточного-иммуноглобулинового-муцинового домена (TIM-1) является диагностически значимым при различных патологических состояниях организма. Целью настоящей работы была разработка ПЦР-системы для анализа уровня экспрессии гена TIM-1 с детекцией в режиме реального времени. Проведен дизайн праймеров и флуоресцентного зонда на консервативные участки гена TIM-1. Фрагмент гена был клонирован в плазмиду, которая в дальнейшем использовалась в качестве положительного контроля. Оптимизацию условий ПЦР проводили с использованием в качестве модели культуры клеток НЕК293 (клетки почки эмбриона человека). Уровни экспрессии гена TIM-1 были определены в слюне десяти здоровых доноров, и они достоверно не отличались между собой. Разрабатываемая система может быть альтернативой закрытым коммерческим системам. В дальнейшем мы планируем проведение исследований экспрессии гена TIM-1 при различных патологиях.

Ключевые слова: рецептор, TIM-1, количественная ПЦР, ПЦР в реальном времени, иммунный ответ, экспрессия гена

DOI: 10.31857/S102872210006750-0

Адрес: 630559, р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия, ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», Роспотребнадзора, отдел молекулярной вирусологии флавивирусов и вирусных гепатитов, лаборатория молекулярной эпидемиологии ООИ. Бондаренко Т. Ю. Тел./факс: +7(383) 3634700, 2164.

E-mail: lemtat@ngs.ru

Авторы:

Бондаренко Т. А., к.б.н., научный сотрудник лаборатории молекулярной эпидемиологии ООИ, отдела молекулярной вирусологии флавивирусов и вирусных гепатитов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия;

Святченко В. А., к.б.н., зав. лабораторией вирусологии флавивирусов, ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия;

Терновой В. А., к.б.н., зав. лабораторией молекулярной эпидемиологии ООИ, ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия.

ВВЕДЕНИЕ

Семейство генов человека Т-клеточного-иммуноглобулинового-муцинового домена (5q33.2) один из участников регуляции иммунологического ответа и реакций на вирусные инфекции. Являющийся представителем этого семейства,

ген TIM-1 преимущественно экспрессируется клетками Т-хелперов 2 типа и функционирует в качестве костимулирующей молекулы для активации Т-клеток [1]. Впервые TIM-1 был открыт как рецептор вируса гепатита А [2]. Повышенный уровень экспрессии TIM-1 характерен при аутоиммунных нарушениях, повреждениях почек различного генеза и др. [3, 4]. Много работ проведено по поиску генетических полиморфизмов промоторного района и 4-го экзона TIM-1 при различных патологических состояниях у людей из разных географических районов [3]. Существуют ИФА тест-системы для выявления белка, кодируемого TIM-1. Однако повышению уровня белка предшествует повышение уровня экспрессии гена, и в связи с этим целью данной работы было создание системы для анализа уровня экспрессии гена человека TIM-1.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культура клеток НЕК293 (клетки почки эмбриона человека) была получена из банка кле-

точных культур ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор». Клетки отбирали на фазе логарифмического роста. Выделение тотальной РНК и синтез кДНК проводили согласно [5]. Были подобраны праймеры и флуоресцентный зонд на консервативные участки, комплементарные районам 3–4 экзона ТИМ-1. После обратной транскрипции проводили ПЦР в режиме реального времени на приборе CFX-96.

Фрагмент гена ТИМ-1 был клонирован в плазмиду, которая в дальнейшем использовалась в качестве положительного контроля. Соотношение генома вставки к вектору было 0.09. Концентрация ДНК плазмиды измерялась на флуориметре QUBIT. Для построения стандартной калибровочной кривой были приготовлены последовательные 10-кратные разведения плазмиды. ПЦР-фрагменты и встройка в плазмиду были секвенированы.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Оптимизацию условий ПЦР проводили на модели культуры клеток НЕК293. Выбранные нами праймеры были комплементарны разным экзонам, что позволяет использовать для анализа образцы с содержанием ДНК. В качестве мишеней были выбраны наиболее консервативные участки генома. Специфичность анализируемых районов генома была подтверждена секвенированием. Уровень экспрессии ТИМ-1 вычислялся с помощью стандартной кривой и на модели культуры клеток НЕК293 для лизата 10^5 клеток составил 3.6×10^{-18} М/мл.

В последнее время большие надежды возлагаются на неинвазивные методы взятия матери-

ала, и слюна является одним из них. В слюне десяти здоровых добровольцев уровни экспрессии гена ТИМ-1 достоверно не отличались между собой. В дальнейшем мы планируем проведение исследований экспрессии гена ТИМ-1 при различных патологиях.

Таким образом, нами была разработана и апробирована ПЦР-система для определения уровня экспрессии гена ТИМ-1 в режиме реального времени.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Freeman G. J., Casasnovas J. M., Umetsu D. T., De Kruyff R. H. TIM genes: a family of cell surface phosphatidylserine receptors that regulate innate and adaptive immunity. *Immunol Rev.* 2010 May; 235(1):172–89.
2. Feigelstock D., Thompson P., Mattoov P., Zhang Y., Kaplan G. G. The human homolog of HAVcr-1 codes for a hepatitis A virus cellular receptor. *J Virol.* 1998 Aug; 72(8):6621–8.
3. Chae S. C., Song J. H., Lee Y. C., Kim J. W., Chung H. T. The association of the exon 4 variations of Tim-1 gene with allergic diseases in a Korean population. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003 Dec 12; 312(2):346–50.
4. Moresco R. N., Bochi G. V., Stein C. S., De Carvalho J. A. M., Cembranel B. M., Bollick Y. S. Urinary kidney injury molecule-1 in renal disease. *Clin Chim Acta.* 2018 Dec; 487:15–21.
5. Bondarenko T. Y., Ternovoi V. A., Svyatchenko V. A., Kiselev N. N., Chausov E. V., Muntyanova M. U., Nemtsov Y. V., Yashin V. V., Kryuk N. I., Kuslii A. G., Nikulin L. G., Netesov S. V. Complete genomic sequence of rapidly replicating strain MB-7 of hepatitis a virus and its characterization in comparison with nucleotide sequence of other hepatitis a virus strain. *Mol. Genet. Microbiol. Virol.* 2010; 25: 39–46.

ANALYSIS OF LEVEL EXPRESSION OF THE HUMAN GENE TIM-1 USING REAL-TIME QUANTITATIVE PCR

© 2019 T. Yu. Bondarenko*, V. A. Svyatchenko, V. A. Ternovoi

*E-mail: lemtat@ngs.ru

FBUN State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Rospotrebnadzor,
Koltsovo, Novosibirsk Region, Russia

Received: 14.03.2019. Accepted: 29.03.2019

The expression level of a human T-cell immunoglobulin-mucin domain (TIM-1) gene is diagnostically significant in human diseases. The purpose of this work was to develop a real-time PCR method for analysis the expression levels of the human TIM-1 gene. The design of primers and fluorescent probe on the conservative parts of the TIM-1 gene was carried out. The fragment of the TIM-1 gene was cloned into a plasmid and further it was used as a positive control. The optimization of the PCR conditions was performed using the HEK293 cell culture as a model. The expression levels of the TIM-1 gene were determined in the saliva of ten healthy volunteers and they did not differ significantly. The system being developed may be an alternative to closed commercial systems. We plan to use it in the research of different pathologies in the future.

Key words: receptor, TIM-1, quantitative PCR, real-time PCR, immune response, gene expression

Authors:

Bondarenko T. Yu., ✉ PhD, Researcher of Laboratory of Molecular Epidemiology EDI, FBUN State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Rospotrebnadzor, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russia. **E-mail:** lemtat@ngs.ru;

Svyatchenko V. A., PhD, Head of Laboratory of virology of flaviviruses, FBUN State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Rospotrebnadzor, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russia;

Ternovoi V. A., PhD, Head of Laboratory of Molecular Epidemiology EDI, FBUN State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Rospotrebnadzor, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russia.

ЭКСПРЕССИЯ ПЛЕКСИНА V1 Т-ЛИМФОЦИТАМИ ЧЕЛОВЕКА: РОЛЬ В КОНТРОЛЕ АКТИВАЦИИ КЛЕТОК

© 2019 г. Ю. В. Валиева*, Е. М. Куклина

*E-mail: valieva.jul.v@gmail.com

«Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук» — филиал ФГБУН Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук, Пермь, Россия

Поступила: 09.03.2019. Принята: 20.03.2019

В работе представлены новые данные, касающиеся экспрессии Т-лимфоцитами плексина V1 — высокоаффинного рецептора для семафорина IV класса Sema4D, экспрессия которого ранее приписывалась исключительно не иммунным клеткам. Обсуждается биологическое значение этого феномена и его роль в регуляции функций Т-лимфоцитов, в первую очередь — клеточной миграции.

Ключевые слова: Т-лимфоциты, Sema4D, плексин V1, миграция

DOI: 10.31857/S102872210006723-0

Адрес: 614081 Пермь, ул. Голева, д. 13, «Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук» — филиал ФГБУН Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук, Валиева Юлия Вакифовна. Тел./факс: +7(342) 2809211.

E-mail: valieva.jul.v@gmail.com

Авторы:

Валиева Ю. В., аспирант, младший научный сотрудник лаборатории иммунорегуляции «Института экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук» — филиала ФГБУН Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук, Пермь, Россия;

Куклина Е. М., д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории иммунорегуляции «Института экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук» — филиала ФГБУН Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук, Пермь, Россия.

Плексин V1 — трансмембранная молекула семейства плексинов, которая служит высокоаффинным рецептором для семафорина Sema4D. Он интенсивно экспрессируется нейронами и играет ключевую роль в процессах аксонального наведения, опосредуя репульсивные эффекты семафорина в центральной нервной системе. Однако функции Sema4D не ограничиваются аксональным наведением: семафорин экспрессируется многими тканями организма,

в первую очередь — иммунной. При этом, согласно принятым представлениям, эффекты Sema4D в иммунной системе реализуются через низкоаффинный рецептор CD72: убедительно показано участие Sema4D/CD72-зависимого сигнала в контроле функций В-лимфоцитов и дендритных клеток, несущих на мембране этот рецептор [1]. Что касается плексина V1 — предполагается, что он опосредует эффекты семафорина исключительно в неиммунных тканях [2]. Тем не менее, в литературе имеются данные, косвенно указывающие на наличие плексиновых рецепторов на иммунocyтах, в частности, данные о способности Sema4D ингибировать инфильтрацию опухолей лимфоидными клетками [3] — ведь именно плексин V1-зависимый сигнал индуцирует перестройку цитоскелета и отвечает за клеточную подвижность [4].

Мы в недавней работе показали, что высокоаффинный семафоринный рецептор плексин V1 представлен на мембране лимфоцитов (грант РФФИ 15-04-05694) [5]. Последующие более детальные исследования *ex vivo* выявили, что плексин V1 экспрессируется как наивными Т-лимфоцитами (CD3⁺CD4⁺CD45RA⁺/CD3⁺CD8⁺CD45RA⁺-клетками), так и Т-клетками памяти (CD3⁺CD4⁺CD45R0⁺/CD3⁺CD8⁺CD45R0⁺-лимфоцитами), причем уровень экс-

прессии плексина этими субпопуляциями сопоставим. Более того, в исследованиях *in vitro* показано, что фракционированные CD3⁺Т-лимфоциты (система для фракционирования, R&D Systems) в ответ на поликлональную активацию (анти-CD3/CD28, Invitrogen) усиливают экспрессию плексиновых рецепторов на мембране.

Присутствие плексина В1 на мембране Т-лимфоцитов поднимает вопрос о биологическом значении этого феномена и роли данных рецепторов в контроле активности клеток. И наиболее очевидная мишень Sema4D/плексин В1-зависимого сигнала – миграция Т-лимфоцитов, поскольку в неиммунных тканях связывание этого рецептора ведет к перестройке цитоскелета.

Механизмы реализации семафорин/плексин В1-зависимого сигнала наиболее детально изучены в нейронах. Они предполагают регуляцию активности малых ГТФаз семейств Ras и Rho, способных связываться с соответствующими доменами в цитоплазматическом регионе молекулы плексина [6]. Действие ГТФазы Rho напрямую связано с реорганизацией цитоскелета, причем реализуется оно двумя путями – регуляцией актомиозина и сборки микротрубочек – последний эффект опосредуется белком, служащим медиатором коллапсинового ответа (Collapsin Response Mediator Protein 2, CRMP2). Основная функция белка Ras, инициируемая при связывании семафорина с плексином – регуляция сборки микротрубочек [6]. Важно отметить, что для всех ключевых элементов упомянутой выше сигнальной цепочки показано участие в Sema4D/плексин В1-зависимом ингибировании аксонального роста [6]. А поскольку все перечисленные выше внутриклеточные факторы, участвующие в передаче сигнала с плексина В1 в нейронах, присутствуют и в лимфоцитах, логично ожидать наличия аналогичных механизмов сигнализации в лимфоидных клетках.

Необходимость исследования роли Sema4D в контроле миграции Т-клеток диктуется также показанным недавно участием семафорина в развитии широкого спектра опухолевых заболеваний. Он секретируется рядом опухолей, концентрируется на границе опухоли и препятствует ее инфильтрации иммунными клетками, в том числе – Т-лимфоцитами [3]. Поэтому результаты работы будут иметь большую практическую значимость.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-015-00367.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Kumanogoh A., Kikutani H. Semaphorins and their receptors: novel features of neural guidance molecules. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 2010, 86, 611–620.
2. Zhang Y., Liu B., Ma Y., Jin B. Sema 4D/CD100-plexin B is a multifunctional counter-receptor. *Cell Mol Immunol.* 2013, 10, 97–98.
3. Evans E., Jonason S., Bussler H., Torno S., Veeraraghavan J., Reilly C., Doherty A., Seils J., Winter A., Mallow C., Kirk R., Howell A., Giralico S., Scrivens M., Klimatcheva K., Fisher L., Bowers J., Paris M., Smith S., and Zauderer M. Antibody Blockade of Semaphorin 4D Promotes Immune Infiltration into Tumor and Enhances Response to Other Immunomodulatory Therapies. *Cancer Immunol.* 2015, 3, 689–701.
4. Hung R., Terman J. Extracellular inhibitors, repellents, and semaphorin/plexin/MICAL-mediated actin filament disassembly. *Cytoskeleton (Hoboken).* 2011, 68, 415–433.
5. Куклина Е. М., Некрасова И. В. Новые аспекты Sema4D-зависимого контроля активации лимфоцитов. Доклады Академии наук. 2017, 473, 1–5. [Kuklina E. M., Nekrasova I. V. New aspects of Sema4D-dependent lymphocyte activation control. *Doklady biological sciences.* 2017, 473, 1–5].
6. Oinuma I., Ishikawa Y., Katoh H., and Negishi M. The Semaphorin 4D receptor Plexin-B1 is a GTPase activating protein for R-Ras. *Science.* 2004, 305, 862–865.

**EXPRESSION OF PLEXIN B1 BY HUMAN T LYMPHOCYTES: ROLE
IN THE CONTROL OF CELL ACTIVATION**

© 2019 Yu. V. Valieva*, E. M. Kuklina

*E-mail: valieva.jul.v@gmail.com

«Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch,
Russian Academy of Sciences», Perm, Russia

Received: 09.03.2019. **Accepted:** 20.03.2019

The paper presents new data on T-lymphocyte expression of plexin B1, a high-affinity receptor for class IV semaphorin Sema4D, which expression was previously attributed exclusively to non-immune cells. The biological significance of this phenomenon, as well as its role in the regulation of T-lymphocyte functions are discussed, primarily of cell migration.

Key words: T-lymphocytes, Sema4D, plexin B1, migration

Authors:

Valieva Yu.V., ☒ post graduate student, junior researcher, Laboratory of Immunoregulation, «Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch, Russian Academy of Sciences», Perm, Russia. **E-mail:** valieva.jul.v@gmail.com;

Kuklina E.M., Doctor of Biology, Leading Researcher, Laboratory of Immunoregulation, «Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch, Russian Academy of Sciences», Perm, Russia.

ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА РЕКОМБИНАНТНОГО АНТИТЕЛА К C5a АНАФИЛОТОКСИНУ КОМПЛЕМЕНТА

© 2019 г. А. А. Василишина*, А. В. Демьянов, В. С. Монахова, А. В. Жахов, А. В. Трофимов, Е. С. Денисенко, К. А. Некрасова, С. В. Родин, А. С. Симбирцев, А. М. Ищенко

*E-mail: a.a.vasilishna@hpb.spb.ru

ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов»
Федерального медико-биологического агентства, Санкт-Петербург, Россия

Поступила: 15.03.2019. Принята: 26.03.2019

Получены моноклональные мышинные антитела к C5a анафилотоксину человека, в последовательностях легкой и тяжелой цепей которых была произведена замена константных областей на константные области иммуноглобулина G человека с целью получения химерных (мышь—человек) антител.

Ключевые слова: комплемент, моноклональные антитела, C5a анафилотоксин человека

DOI: 10.31857/S102872210006722-9

Адрес: 197110 Санкт-Петербург, ул. Пудожская, д. 7, ФГУП «Гос. НИИ ОЧБ «ФМБА России. Василишина Анастасия Анатольевна. Тел. 8(812) 499 16 61.

E-mail: a.a.vasilishna@hpb.spb.ru

Авторы:

Василишина А. А., биолог лаборатории биохимии белка ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия;

Демьянов А. В., начальник лаборатории иммунофармакологии ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия;

Монахова В. С., биолог лаборатории биохимии белка ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия;

Жахов А. В., в.н.с. лаборатории биохимии белка ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия;

Трофимов А. В., руководитель группы лаборатории биохимии белка ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия;

Денисенко Е. С., проектный менеджер ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия;

Некрасова К. А., заместитель начальника отдела организации НИР ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия;

Родин С. В., руководитель группы лаборатории биохимии белка ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия;

Симбирцев А. С., член-корреспондент РАН, д.м.н., профессор, научный руководитель ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия;

Ищенко А. М., к.б.н., начальник лаборатории биохимии белка ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия.

Бактерии и их производные могут активировать комплемент тремя известными путями: классическим, лектиновым и альтернативным. Во всех случаях в результате активации происходит образование анафилотоксинов C3a, C4a и C5a. В норме собственные клетки организма хозяина защищены от активирующего действия комплемента регуляторными белками. Однако в патогенезе воспалительных заболеваний продукты активации комплемента являются одними из основных провоспалительных агентов. Накопление анафилотоксинов, в особенности C5a, сопровождается эскалацией воспаления и часто приводит к тяжелому течению болезни [1, 2].

Объектом настоящего исследования является нейтрализующее антитело к анафилотоксину C5a, поскольку нейтрализация или удаление избытка этого анафилотоксина положительно влияет на исход тяжелых воспалительных заболеваний, включая ССВО и сепсис [3].

Специфическая экстракорпоральная гемокоррекция является оптимальным и современ-

ным методом удаления патогенетических агентов, поэтому **целью** настоящей работы стало получение рекомбинантных химерных антител к C5a анафилотоксину комплемента человека с экспрессией в клетках НЕК293 для дальнейшего создания иммуносорбента, допустимого к применению в клинической медицине.

Для определения нуклеотидной и аминокислотной последовательности антитела к C5a, полученного в клетках мышинной гибридомы, было выполнено выделение тотальной РНК соответствующей гибридомы и получение на ее основе кДНК. Далее методом ПЦР с использованием набора вырожденных праймеров амплифицировали фрагменты кДНК, кодирующие переменные участки тяжелой и легкой цепи иммуноглобулинов. Полученные ПЦР-продукты очищали и секвенировали по методу Сэнгера. Структурно-функциональный анализ полученных последовательностей, который проводили с помощью онлайн сервисов IMGT/V-QUEST и IgBLAST, показал, что все ПЦР-продукты соответствовали одной тяжелой цепи, одной легкой каппа цепи мышинного иммуноглобулина и 1 aberrантной легкой цепи из миеломы Sp2/0.

Для получения химерных генов была проведена амплификация сигнальной последовательности, последовательностей генов *IGHG1* и *IGKC*, кодирующих константные области тяжелой и легкой цепи иммуноглобулина человека, и последовательностей переменных доменов тяжелой и легкой цепи кандидатного мышинного иммуноглобулина. В качестве матрицы для амплификации сигнального пептида и константных доменов были использованы плазмиды с химерными антителами к другому антигену, разработанные нами ранее. Дизайн праймеров для амплификации данных фрагментов был осуществлен таким образом, чтобы полученные ПЦР-продукты частично перекрывались между собой. Далее была произведена сборка соответствующих фрагментов, имеющих частичное перекрытие, методом ПЦР. Полученные последовательности химерных генов тяжелой и легкой цепи были лигированы в неэкспрессионный вектор pJET и клонированы в *E.coli*. Далее была произведена селекция клонов с нужной последовательностью с помощью ПЦР и секвенирования. Затем химерные гены были переклонированы по сайтам рестрикции

NheI и NotI в экспрессионный плазмидный вектор pOptiVec. После селекции клонов плазмидная ДНК была наработана в *E.coli* и выделена с высокой степенью очистки для трансфекции. Результирующие векторы были обозначены pOptiVec/C5a2H и pOptiVec/C5a2L.

Векторы pOptiVec/C5a2H и pOptiVec/C5a2L были использованы для временной экспрессии в клетках линии НЕК293 (эмбриональные клетки почки человека). Трансфекция клеток НЕК293 проводилась с помощью липофильного реагента по инструкции производителя. Трансфицированные клетки культивировали в течение 5 суток в CO₂-инкубаторе при 5% CO₂, 37 °C. Затем отбирали культуральную жидкость, в которой определяли концентрацию антител к C5a анафилотоксину человека с помощью иммуноферментного анализа с моноклональными мышинными антителами против IgG1 человека. Из культуральной жидкости выделяли антитела с помощью аффинной хроматографии на белке А. После определения видоспецифичности антител методом ИФА, установили степень связывания химерного антитела с белком C5a. С помощью поверхностного плазмонного резонанса с использованием антител к IgG человека, иммобилизованных в проточной ячейке прибора, были получены следующие характеристики связывания антитела с белком C5a человека:

- константа ассоциации $K_a = 2.245 \times 10^8$ 1/Мс;
- константа диссоциации $K_d = 0.01342$ 1/с;
- равновесная константа диссоциации $K_D = 5.976 \times 10^{-11}$ М.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что экспериментальные образцы рекомбинантных химерных антител к C5a компоненту комплемента могут быть использованы для создания специфического гемосорбента или в качестве средства лечения заболеваний, связанных с гиперактивацией комплемента.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. *Chunguang Yan, Hongwei Gao.* New insights for C5a and C5a receptors in sepsis. *Front Immunol.* 2012, 5, 197.
2. *Aird W.C.* The role of the endothelium in severe sepsis and multiple organ dysfunction syndrome. *Blood.* 2003, 101, 3765–3777.
3. *Peter A. Ward* Role of C5 Activation Products in Sepsis. *The Scientific World Journal.* 2010, 10, 2395–24022010.

GENERATION AND CHARACTERIZATION OF RECOMBINANT ANTIBODY AGAINST THE COMPLEMENT C5a ANAPHYLATOXIN

© 2019 A. A. Vasilishina*, A. V. Demyanov, V. S. Monahova,
A. V. Zhakhov, A. V. Trofimov, E. S. Denisenko, K. A. Nekrasova,
S. V. Rodin, A. S. Simbirtsev, A. M. Ischenko

*E-mail: a.a.vasilishna@hpb.spb.ru

State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Saint Petersburg, Russia

Received: 15.03.2019. Accepted: 26.03.2019

Monoclonal mouse antibodies were raised against the human C5a anaphylatoxin. In these antibodies, the light- and heavy-chain constant regions were replaced by human IgG constant regions to produce chimeric mouse–human antibodies.

Key words: complement, monoclonal antibodies, human C5a anaphylatoxin

Authors:

Vasilishina A. A., ✉ MD, Biologist of Laboratory of Protein Biochemistry, State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Saint Petersburg, Russia. E-mail: a.a.vasilishna@hpb.spb.ru;

Demyanov A. V., MD, Head of Laboratory of Immunopharmacology, State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Saint Petersburg, Russia;

Monahova V. S., Biologist, Laboratory of Protein Biochemistry, State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Saint Petersburg, Russia;

Zhakhov A. V., Leading Researcher, Laboratory of Protein Biochemistry, State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Saint Petersburg, Russia;

Trofimov A. V., Group Leader, Laboratory of Protein Biochemistry, State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Saint Petersburg, Russia;

Denisenko E. S., Project Manager, State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Saint Petersburg, Russia;

Nekrasova K. A., Deputy Head of R&D Department, State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Saint Petersburg, Russia;

Rodin S. V., Group Leader, Laboratory of Protein Biochemistry, State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Saint Petersburg, Russia;

Simbirtsev A. S., RAS Corresponding Member, DMedSci, Professor, Scientific Supervisor of State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Saint Petersburg, Russia;

Ischenko A. M., PhD, Head of Laboratory of Protein Biochemistry, State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Saint Petersburg, Russia.

УРОВЕНЬ ЦИТОКИНОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ У ПАЦИЕНТОВ С ПРИОБРЕТЕННЫМ АНГИООТЕКОМ

© 2019 г. А. О. Власова

E-mail: a.vlasova.vl@gmail.com

КГБУЗ «Владивостокский клинико-диагностический центр», Владивосток, Россия

Поступила: 26.02.2019. Принята: 12.03.2019

Цитокины являются биологическими маркерами, гиперпродукция которых может привести к воспалительной реакции и стать причиной развития патологических реакций. В настоящей работе исследовано содержание IL-17A, IL-17F и IL-13 в сыворотке крови 36 пациентов с приобретенным ангиоотекотом в период клинических проявлений. Контрольная группа включала 10 практически здоровых доноров. Данное исследование показало высокий уровень IL-17A, IL-17F у пациентов с приобретенным ангиоотекотом, в то время как сравнительный анализ не показал различий в содержании сывороточного IL-13 в исследуемой и контрольных группах. Таким образом, определение уровня IL-17A, IL-17F в сыворотке крови может быть использовано как лабораторный диагностический маркер приобретенного ангиоотека.

Ключевые слова: приобретенный ангиоотек, цитокины, IL-17A, IL-17F, IL-13

DOI: 10.31857/S102872210006721-8

Автор:

Власова А. О., врач аллерголог-иммунолог Аллерго-респираторного центра, КГБУЗ «Владивостокский клинико-диагностический центр», Владивосток, Россия.

АКТУАЛЬНОСТЬ

Цитокины представляют собой группу полипептидных медиаторов межклеточного взаимодействия, которые могут быть выделены в самостоятельную систему регуляций функций организма, наряду с нервной и эндокринной. Гиперпродукция цитокинов ведет к развитию системной воспалительной реакции и может служить причиной развития ряда патологических состояний [1]. Изучение уровня цитокинов может не только уточнить патогенетические механизмы развития приобретенного ангиоотека, но и выявить возможную прогностическую значимость отдельных форм цитокинов.

Известно, что при наследственном ангионевротическом отеке играет роль IL-17, который участвует в воспалительных реакциях и инициирует воспалительный процесс [2]. Цитокин IL-13, как плеiotропный цитокин, действует через комплекс IL-13Ra1/IL-4Ra, участвует в развитии гуморального иммунного ответа, вызывая реакции активации, которые способствуют воспалительным заболеваниям [3].

Цель исследования — изучение сывороточного содержания IL-17A, IL-17F, IL-13 у пациентов с приобретенным ангиоотекотом.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование включено 36 пациентов с верифицированным диагнозом приобретенный идиопатический ангиоотек и 10 практически здоровых доноров, наблюдавшихся в Городском аллерго-респираторном центре КГБУЗ «Владивостокский клинико-диагностический центр» (главный врач А. А. Кабиева). Клинико-лабораторное обследование проводили на кафедре клинической лабораторной диагностики, общей и клинической иммунологии и центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО ТГМУ Минздрава России (ректор В. Б. Шуматов).

Материалом исследования являлась сыворотка крови. Забор крови проводился в период клинических проявлений.

Определение содержания IL-17A, IL-17F, IL-13 проводилось иммуноферментным анализом реактивами фирмы eBiociens (Bender Medsystems GmbH, Австрия) в пикограммах в миллилитре (пг/мл)

Для статистической обработки цифровых данных использовали непараметрический ме-

тод, так как распределение отличалось от нормального и коэффициенте вариации составлял $CV > 30\%$. Использовалась программа статистики «Statistica 10». Проводили подсчет медианы (Me), нижнего и верхнего квартиля (LQ-HQ). Объем выполненных исследований и использование соответствующих статистических методов позволило оценить результаты с достоверностью и критическим уровнем значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Показатели сывороточного содержания IL-17A у пациентов с приобретенным ангиоотеком определялись с медианой (Me) 14,72 пг/мл, нижним и верхним квартилями (LQ-HQ) 9,27–20,49 пг/мл, в контрольной группе 6,65 пг/мл и 3,675–12,635 пг/мл, $p < 0,05$ соответственно. Показатели IL-17F в исследуемой группе имели Me=43,48 пг/мл, LQ-HQ 34,53–55,84 пг/мл, у практически здоровых доноров уровень IL-17F статистически значимо отличался 7,705 пг/мл, 5,4825–8,9975 пг/мл, $p < 0,05$. Значение сывороточного содержания IL-13 в исследуемой группе значимо не отличалось от контрольной 13,6 пг/мл, 6,8–24,65 пг/мл, и 16,25 пг/мл, 10,925–18,6 пг/мл, $p < 0,05$.

ОБСУЖДЕНИЕ

Данное исследование показало высокий уровень IL-17A, IL-17F у пациентов с приобретенным ангиоотеком, в то время как сравнительный анализ не показал различий в содержании сывороточного IL-13 в исследуемой и контрольной группе. Таким образом, определение уровня IL-17A, IL-17F в сыворотке крови может быть использовано как лабораторный диагностический маркер приобретенного ангиотека.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. *Кетлинский С.А., Симбирцев А. С.* Цитокины. Фолиант, СПб 2008, 9–11. [Ketlinsky S. A., Simbirtsev A. S. Cytokines. Foliant, St. Petersburg 2008, 9–11.]
2. *Arcoleo Francesco, Lo Pizzo Mariangela, Misiano Gabriella, Milano Salvatore, Colonna Romano Giuseppina, MuggeoVito, Cillari Enrico.* The complex alteration in the network of IL-17-type cytokines in patients with hereditary angioedema. *Clinical and Experimental Medicine* August 2018, Volume 18, Issue 3, pp 355–36.
3. *Narges Seyfizadeh, Nayer Seyfizadeh, Tohid Gharibi, Zohreh Babaloo.* Interleukin-13 as an important cytokine: A review on its roles in some human diseases. *Acta Microbiol Immunol Hung.* 2015 Dec;62(4): 341–78.

CYTOKINE LEVEL IN BLOOD SERUM IN PATIENTS WITH ACQUIRED ANGIOEDEMA

© 2019 A. O. Vlasova

E-mail: a.vlasova.vl@gmail.com

Regional State Budgetary Healthcare Institution «Vladivostok Clinical and Diagnostic Centre», Vladivostok, Russia

Received: 26.02.2019. Accepted: 12.03.2019

Cytokines are biological markers whose overproduction can lead to an inflammatory reaction and cause the development of pathological reactions. In the present work, the serum levels of IL-17A, IL-17F and IL-13 were studied in 36 patients with acquired angioedema during the period of clinical manifestations. The control group consisted of 10 practically healthy donors. This study showed a high level of IL-17A, IL-17F in patients with acquired angioedema during the period of clinical manifestations, while a comparative analysis showed no differences in the content of serum IL-13 in the control group and the control group. Thus, the determination of the level of IL-17A, IL-17 F in serum can be used as a laboratory diagnostic marker of acquired angioedema.

Key words: acquired angioedema, interleukin-17 system, interleukin-13

Author:

Vlasova A. O., allergist-immunologist, Allergy-Respiratory Center, Vladivostok Clinical Diagnostic Center, Vladivostok, Primorsky Krai, Russia.

РОЛЬ БЕЛКА DRP1, ОТВЕТСТВЕННОГО ЗА ФРАГМЕНТАЦИЮ МИТОХОНДРИЙ, В ОКИСЛИТЕЛЬНОМ ВЗРЫВЕ И НЕТОЗЕ НЕЙТРОФИЛОВ ЧЕЛОВЕКА

© 2019 г. Н. В. Воробьева^{1*}, В. В. Кулаков²

*E-mail: nvvorobjeva@mail.ru

¹МГУ имени М. В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, Россия;

²Институт иммунологии ФМБА России, Москва, Россия

Поступила: 15.03.2019. Принята: 02.04.2019

Митохондрии нейтрофилов находятся в состоянии динамического равновесия, которое поддерживается двумя противоположными процессами: слиянием и фрагментацией. Многочисленные исследования показали, что морфология митохондрий тесно связана с их функциональной активностью. Вместе с тем, было обнаружено, что белки, участвующие в процессе митохондриальной динамики, могут модулировать и другие функции митохондрий. В нашей работе, проведенной на нейтрофилах человека, было показано, что динамин-подобный белок 1 (DRP1), ответственный за фрагментацию митохондрий, участвует в НЕТозе, реализуя свою классическую функцию. В то же время, подавление окислительного взрыва при ингибировании DRP1 было вероятно обусловлено его неклассической функцией, связанной с работой митохондриальной поры.

Ключевые слова: нейтрофилы, нейтрофильные внеклеточные ловушки, НЕТоз, окислительный взрыв, NADPH-оксидаза, фрагментация митохондрий

DOI: 10.31857/S102872210006720-7

Адрес: 119991 Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12. МГУ имени М. В. Ломоносова, Биологический факультет.

Воробьева Нина Викторовна. Тел. +7 916 820 88 37 (моб.).

E-mail: nvvorobjeva@mail.ru

Авторы:

Воробьева Н. В., к.б.н., старший научный сотрудник ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова», Москва, Россия;

Кулаков В. В., д.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клинической иммунологии, ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, Москва, Россия.

ВВЕДЕНИЕ

Нейтрофилы осуществляют защиту организма от патогенов, используя такие эффекторные функции как фагоцитоз, дегрануляцию и образование активных форм кислорода (АФК). Было также показано [1], что нейтрофилы обладают еще одним уникальным свойством – способностью выбрасывать наружу деконденсированные фибриллы ДНК, которые в очаге воспаления играют роль ловушек для патогенов, ограничивая их распространение по организму. У нейтрофилов такие образования были названы нейтрофильные внеклеточные ловушки (NET или

NETs, от Neutrophil Extracellular Traps), а процесс их образования, ведущий к гибели нейтрофилов – НЕТозом (NETosis).

Несмотря на то, что функциональная роль НЕТоза является общепризнанной, механизмы образования ловушек до конца не изучены. НЕТоз был в значительной степени исследован в системе *in vitro* при стимуляции нейтрофилов активатором протеинкиназы С, ФМА. Было показано, что в сигнальном каскаде активации NET участвуют такие белки гранул, как нейтрофильная эластаза и миелопероксидаза, а также пептидил-аргинин дезаминаза 4 типа. Так же, известно, что для осуществления НЕТоза нужны активные формы кислорода (АФК), которые, как правило, образуются в процессе окислительного взрыва при участии ферментного комплекса NADPH-оксидазы.

В настоящее время накоплено немало фактов, говорящих, что помимо NADPH-оксидазы в НЕТозе могут также принимать участие митохондрии и, соответственно, митохондриальные АФК (мТАФК) [2]. Так, ранее мы показали, что в НЕТозе, активированном кальциевыми ионо-

форами и хемоаттрактантом fMLP, принимает участие митохондриальная пора (mPTP), многокомпонентный канал, расположенный во внутренней мембране митохондрий и вовлеченный в регуляцию клеточной смерти и выбросе Ca^{+2} и мтАФК из матрикса. Известно, что митохондрии способны образовывать динамические тубулярные сети, непрерывно изменяющие свою форму благодаря процессам слияния и фрагментации (процесс митохондриальной динамики). Было показано, что белки, участвующие в этом процессе, обладают также способностью модулировать многие функции митохондрий, например, митохондриальное дыхание, используя при этом механизмы, не относящиеся прямо к изменению морфологии. Так, в своей недавней работе, проведенной на кардиомиоцитах крыс, Цанг и соавт. [3] показали, что DRP1, известный регулятор фрагментации митохондрий, усиливает митохондриальное дыхание опосредованно, через mPTP.

Мы предположили, что НЕТоз и окислительный взрыв нейтрофилов человека, тесно связанные с функциональной активностью митохондрий, могут зависеть не только от их морфологии, но и от белков, регулирующих процесс митохондриальной динамики, например, от DRP1.

МЕТОДЫ

Выделение нейтрофилов

Нейтрофилы выделяли из периферической крови здоровых доноров или больных хронической гранулематозной болезнью (ХГБ) методом центрифугирования в одноступенчатом градиенте плотности Фикола (1.077 г/см^3) как описано ранее [4].

Оценка окислительного взрыва

Для оценки суммарных (внутри- и внеклеточных) АФК использовали метод регистрации люминол-зависимой хемилюминесценции [5].

Индукция и флуоресцентное окрашивание нейтрофильных ловушек

Нейтрофильные ловушки индуцировали ФМА или А23187 в клетках, адгезированных на покровных стеклах, в течение 2 ч 40 мин и 4 ч, соответственно, как описано ранее [5].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для оценки участия процесса митохондриальной динамики в НЕТозе и окислительном

взрыве нейтрофилов человека, нами была выбрана хорошо известная ГТФаза, DRP1, ответственная за фрагментацию митохондрий. В работе был применен ингибиторный анализ, в частности, был использован ингибитор DRP1, Mdivi-1. Для оценки участия DRP1 в окислительном взрыве, Mdivi-1 титровали в широком диапазоне концентраций (1–25 мкМ) и далее стимулировали окислительный взрыв индукторами с разными механизмами действия (ФМА, fMLP и А23187). Так, окислительный взрыв под действием ионофора А23187 и fMLP, в отличие от ФМА, напрямую зависел от митохондрий. Было показано дозозависимое подавление окислительного взрыва, индуцированного А23187 и fMLP, но не ФМА, при возрастании концентрации Mdivi-1. Прединкубация нейтрофилов здоровых доноров с Mdivi-1 в течение 30 мин и последующая активация НЕТоза с помощью ФМА и А23187 также показала дозозависимое подавление образования ловушек. Участие белка DRP1 в НЕТозе было подтверждено на нейтрофилах, выделенных из крови больных X-сцепленной ХГБ. Нейтрофилы таких пациентов имели абсолютно неактивную NADPH-оксидазу, что определяли по отсутствию у них окислительного взрыва и ФМА-зависимого НЕТоза. Однако, как было нами показано ранее, нейтрофилы ХГБ образовывали ловушки в ответ на кальциевые ионофоры, что было обусловлено мтАФК. В серии опытов на нейтрофилах ХГБ мы показали, что НЕТоз таких нейтрофилов, индуцированный кальциевыми ионофорами, был подавлен дозозависимым способом при действии возрастающих доз Mdivi-1. Тем самым, было подтверждено, что Mdivi-1 действовал на свою единственную мишень, DRP1, а не на NADPH-оксидазу.

ОБСУЖДЕНИЕ

В нашей работе впервые было показано участие белка DRP1, ответственного за фрагментацию митохондрий, в окислительном взрыве и НЕТозе нейтрофилов человека. Подавление НЕТоза ингибитором DRP1 при его стимуляции ФМА и А23187, то есть, разными по своему механизму действия веществами, говорит о вовлечении в этот процесс классической функции этого белка. Можно предполагать, что митохондриальная динамика, сдвинутая в сторону слияния митохондрий, тормозит процесс образования ловушек, что, возможно, связано с подавлением тубулинового или актинового аппаратов клетки. Вместе с тем, окислительный взрыв нейтрофи-

лов подавлялся в зависимости от того, каким стимулом мы его индуцировали, зависимым (A23187, fMLP) или не зависимым (ФМА) от митохондрий. Такая зависимость окислительного взрыва от типа стимула, вероятнее всего, тоже связана с участием DRP1, однако, действующего в этом случае через митохондриальную пору mPTP, как это было показано для кардиомиоцитов крыс [3].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Brinkmann V., Reichard U., Goosmann C., Fauler B., Uhlemann Y., Weiss D. S., Weinrauch Y., Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria, *Science*, 2004, 303, 1532–1535.
2. Douda D. N., Khan M. A., Grasemann H., Palaniyar N. SK3 channel and mitochondrial ROS mediate NADPH oxidase-independent NETosis induced by calcium influx. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2015, 112, 2817–2822.
3. Zhang H., Wang P., Bisetto S., Yoon Y., Chen Q., Sheu S. S., Wang W. A novel fission-independent role of dynamin-related protein 1 in cardiac mitochondrial respiration. *Cardiovasc. Res.* 2017, 113, 160–170.
4. Vorobjeva N., Prikhodko A., Galkin I., Pletjushkina O., Zinovkin R., Sud'ina G., Chernyak B., Pinegin B. Mitochondrial reactive oxygen species are involved in chemoattractant-induced oxidative burst and degranulation of human neutrophils *in vitro*. *Eur. J. Cell Biol.* 2017, 96, 254–265.
5. Vorobjeva N. V., Pinegin B. V. Effects of the antioxidants Trolox, Tiron and Tempol on neutrophil extracellular trap formation. *Immunobiology*, 2016, 221, 208–219.

THE ROLE OF DRP1 PROTEIN, RESPONSIBLE FOR MITOCHONDRIAL FRAGMENTATION, IN THE OXIDATIVE BURST AND NETOSIS OF HUMAN NEUTROPHILS

© 2019 N. V. Vorobjeva^{1*}, V. V. Kulakov²

*E-mail: nvvorobjeva@mail.ru

¹Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, Moscow, Russia;

²Institute of Immunology, Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia

Received: 15.03.2019. Accepted: 02.04.2019

Neutrophil mitochondria are in a state of dynamic equilibrium, which is supported by two opposite processes: fusion and fission. Numerous studies have shown that the morphology of mitochondria is closely related to their functional activity. However, it was found that proteins involved in the process of mitochondrial dynamics can modulate other functions of mitochondria too. As was shown in our work on the model of human neutrophils, the dynamin-related protein 1 (DRP1) responsible for mitochondrial fission, is involved in NETosis, realizing its classic function. At the same time, the suppression of the oxidative burst via the DRP1 was due to its non-classical function associated with its action on the mitochondrial pore.

Key words: neutrophils, neutrophil extracellular traps, NETosis, oxidative burst, mitochondrial permeability transition pore, mPTP, fragmentation of mitochondria

Authors:

Vorobjeva N. V., ☒ Ph.D., Senior Research Associate, Lomonosov Moscow State University, Russia, Moscow.

E-mail: nvvorobjeva@mail.ru;

Kulakov V. V., Doctor of Medical Sciences, Leading Researcher, Laboratory of Clinical Immunology, Institute of Immunology, Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia.

ИММУННЫЕ НАРУШЕНИЯ И АРТЕРИАЛЬНОЕ ДАВЛЕНИЕ У ПАЦИЕНТОВ С АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТОНИЕЙ

© 2019 г. **Е. В. Гаврилюк***, **А. И. Конопля**, **В. П. Михин**,
Ю. В. Прокофьева, **Л. Н. Серикова**

*E-mail: ganneta@list.ru

ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет»
Минздрава РФ, Курск, Россия

Поступила: 28.02.2019. Принята: 11.03.2019

В исследование было включено 68 пациентов с артериальной гипертонией 1, 2 и 3 степени, у которых в плазме крови определялись концентрация цитокинов и компонентов системы комплемента до и начала и через 4 недели системной антигипертензивной терапии. У пациентов с артериальной гипертонией до начала системной антигипертензивной терапии обнаружены изменения уровня провоспалительных и противовоспалительных цитокинов и активация системы комплемента пропорционально уровню артериального давления. У больных артериальной гипертонией, достигшим целевых значений артериального давления на фоне проводимой фармакотерапии, выраженность иммунных изменений достоверно ниже, чем у пациентов, у которых артериальное давление не достигало целевого уровня.

Ключевые слова: артериальное давление, цитокины, система комплемента, артериальная гипертония

DOI: 10.31857/S102872210006719-5

Адрес: 305041, г. Курск, ул. К. Маркса, 3, ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» Минздрава России, кафедра внутренних болезней № 2, Гаврилюк Евгения Викторовна. Тел.: 8 920 703-19-84 (моб.).

E-mail: ganneta@list.ru

Авторы:

Гаврилюк Е. В., к.м.н., ассистент кафедры внутренних болезней № 2 ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» Минздрава России, Курск, Россия;

Конопля А. И., д.м.н., профессор, заведующий кафедрой биологической химии ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» Минздрава России, Курск, Россия;

Михин В. П., д.м.н., профессор, заведующий кафедрой внутренних болезней № 2 ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» Минздрава России, Курск, Россия;

Прокофьева Ю. В., к.м.н., ассистент кафедры пропедевтики внутренних болезней ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» Минздрава России, Курск, Россия;

Серикова Л. Н., к.м.н., доцент кафедры пропедевтики внутренних болезней ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» Минздрава России, Курск, Россия.

В настоящее время актуальным у пациентов с артериальной гипертонией является поиск биохимических и/или иммунологических биомаркеров для оценки вероятности и сроков по-

ражения органов-мишеней для разработки эффективных способов профилактики [1–2].

В этой связи **целью исследования** стало определение уровня цитокинов и компонентов системы комплемента у больных артериальной гипертонией 1, 2 и 3 степени на фоне проводимой антигипертензивной терапии.

ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ МЕТОДЫ

Под постоянным наблюдением находилось 68 пациентов с верифицированным, согласно клиническим рекомендациям «Артериальная гипертония у взрослых» (2016) и рекомендациям Европейского общества гипертензии и Европейского общества кардиологов (2013), диагнозом: артериальная гипертония 1, 2 и 3 степени (21, 22 и 23 пациента, соответственно), основанном на данных комплекса клинико-инструментальных методов обследования.

Всем пациентам назначалась стартовая антигипертензивная терапия в объеме периндоприл (5 мг/сут) + амлодипин (5 мг/сут) и через 4 недели от начала исследования проводилось двукратное «офисное» измерение артериального давления (АД).

Цитокины (TNF α , IL-6, IL-8, IL-2, IL-1 α , IL-4, IL-10, IL-1Ra) выявляли методом ИФА с использованием наборов ЗАО «Вектор-Бест» (Россия), компоненты системы комплемента (C₃, C_{3a}, C₄, C₅, C_{5a}) и фактор Н – диагностическим набором ООО «Цитокин» (Россия). Активность C₁-ингибитора определяли хромогенным методом по способности ингибировать C₁-эстеразу.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

У больных АГ 1 степени в плазме крови установлено повышение уровня ИЛ-1 α , ФНО α , ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-10, ИЛ-1Ra, ИЛ-2 и неоптерина. Кроме этого у данной категории пациентов в плазме крови выявлено снижение уровня C₃ и C_{5a}-компонентов системы комплемента. При 2 степени АГ в плазме крови еще больше повышен уровень ИЛ-1 α , ИЛ-10, ИЛ-1Ra, неоптерина, а в отличие от пациентов предыдущей группы повышен уровень C_{3a}, C₄-компонентов системы комплемента и фактора Н. Максимальный уровень цитокинов выявлен был у пациентов с АГ III степени, у которых уровень ИЛ-10, ИЛ-1Ra, неоптерина, фактора Н был значительно выше, чем у пациентов предыдущих обеих групп.

У больных 1 группы на фоне стандартной антигипертензивной терапии в плазме крови нормализовались концентрация ИЛ-6 и C₃-компонента комплемента, корригировались уровень ФНО α и ИЛ-1 α , повышалась концентрация ИЛ-1Ra и ИЛ-10.

У пациентов 1 группы проводимая терапия позволила в крови нормализовать концентрацию ИЛ-6, C₃- и C₅-компонентов системы комплемента.

У больных 3 группы проводимое лечение позволило полностью нормализовать в плазме крови концентрацию C₃, C_{3a}, C₄, C₁-ингибитора и повысить уровень РАИЛ, ИЛ-10.

Таким образом, у больных АГ до начала системной антигипертензивной терапии обнару-

жены изменения уровня провоспалительных и противовоспалительных цитокинов и активация системы комплемента пропорционально уровню артериального давления.

Из 68 пациентов с АГ целевого уровня АД через 4 недели достигли только 48 пациентов, в связи с чем нами больные с АГ были разделены на 2 группы: 1 группа включила 20 пациентов, у которых АД не достигло целевого уровня, 2 группы состояла из 48 больных АГ, у которых артериальное давление достигло целевого уровня.

У пациентов из 1 группы достоверно выше, чем у пациентов 2 группы, на момент поступления определялся уровень ФНО α , ИЛ-6, ИЛ-1Ra, C₃, C₄, C₁-ингибитора.

В связи с чем можно констатировать, что у больных артериальной гипертонией, достигшим целевых значений артериального давления на фоне проводимой фармакотерапии, выраженность иммунных изменений достоверно ниже, чем у пациентов, у которых артериальное давление не достигало целевого уровня.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Уклистая Т. А., Полунина О. С., Полунина Е. А., Севостьянова И. В. Анализ взаимосвязи показателей суточного мониторинга артериального давления с маркерами воспаления и оксидативного стресса при сочетанной кардиореспираторной патологии. Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье», 2017, 4, 12–18. [Uklistaya T. A., Polunina O. S., Polunina E. A., Sevostyanova I. V. Analysis of the relationship of indicators of daily blood pressure monitoring with markers of inflammation and oxidative stress in combined cardiorespiratory pathology. Kursk scientific and practical bulletin «Man and his health», 2017, 4, 12–18].
2. Гаврилюк Е. В., Конопля А. И., Караулов А. В. Роль иммунных нарушений в патогенезе артериальной гипертонии. Иммунология, 2016, 37 (1), 29–34 [Gavriluk E. V., Konoplya A. I., Karaulov A. V. The role of immune disorders in the pathogenesis of arterial hypertension. Immunology, 2016, 37 (1), 29–34].

IMMUNE DISORDERS AND ARTERIAL PRESSURE PATIENTS WITH ARTERIAL HYPERTENSION

© 2019 E. V. Gavriilyuk*, A. I. Konoplya, V. P. Mikhin,
Y. V. Prokofieva, L. N. Serikova

*E-mail: ganneta@list.ru

Kursk State Medical University, Kursk, Russia

Received: 28.02.2019. Accepted: 11.03.2019

The study included 68 patients with arterial hypertension 1, 2 and 3 degrees, in whom the concentration of cytokines and components of the complement system was determined in the blood plasma before and after 4 weeks of systemic antihypertensive therapy. In patients with arterial hypertension prior to the onset of systemic antihypertensive therapy, changes in the level of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines and activation of the complement system were found in proportion to the level of blood pressure. In patients with arterial hypertension who have reached the target values of blood pressure against the background of ongoing pharmacotherapy, the severity of immune changes is significantly lower than in patients whose blood pressure has not reached the target level.

Key words: blood pressure, cytokines, the complement system, arterial hypertension

Authors:

Gavriilyuk E. V., ✉ PhD, Assistant of the Department of Internal Diseases № 2 of Kursk State Medical University, Kursk, Russia.

E-mail: ganneta@list.ru;

Konoplya A. I., MD, Professor, Head of the Department of Biological Chemistry of Kursk State Medical University, Kursk, Russia;

Mikhin V. P., MD, Professor, Head of the Department of Internal Diseases № 2 of Kursk State Medical University, Kursk, Russia;

Prokofieva Yu. V., PhD, Assistant of the Department of Internal Medicine Propaedeutic of Kursk State Medical University, Kursk, Russia;

Serikova L. N., PhD, Associate Professor of the Department of Internal Medicine Propaedeutic of Kursk State Medical University, Kursk, Russia.

ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИЕ ЭФФЕКТЫ МИЕЛОПЕПТИДОВ МП-5 И МП-6 ПРИ СТРЕССЕ

© 2019 г. О. Н. Гейн^{5*}, Т. В. Гаврилова^{1,4}, Я. А. Кадочникова³,
М. В. Черешнева², В. А. Черешнев^{2,4}

*E-mail: gein@iegm.ru

¹Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь, Россия;

²ФГБУН Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, Екатеринбург, Россия;

³ФГБОУ ВПО Пермский государственный научно-исследовательский университет, Пермь, Россия;

⁴ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет имени академика Е. А. Вагнера»
Министерства здравоохранения Российской Федерации», Пермь, Россия;

⁵ФГБОУ ВО Пермская государственная фармацевтическая академия МЗ РФ, Пермь, Россия

Поступила: 06.03.2019. Принята: 18.03.2019

Миелопептиды МП-5 и МП-6 способны корригировать изменения продукции активных форм кислорода и цитокинов (IL-1 β и IL-10) перитонеальными макрофагами в условиях стресса.

Ключевые слова: миелопептиды, стресс, макрофаги, цитокины

DOI: 10.31857/S102872210006718-4

Адрес: 614990, г. Пермь, ул. Полевая, 2. ФГБОУ ВО «Пермская государственная фармацевтическая академия» МЗ РФ, кафедра фармакологии, Гейн Оксана Николаевна.
Тел./факс: (8342)282-58-31(сл.), 8-908-277-83-99 (моб.).

E-mail: gein@iegm.ru

Авторы:

Гейн О. Н., к.б.н., доцент кафедры фармакологии ФГБОУ ВО Пермская государственная фармацевтическая академия МЗ РФ, Пермь, Россия;

Гаврилова Т. В., д.м.н., профессор, ведущий научный сотрудник Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, заведующая кафедрой офтальмологии ФГБОУ ВО ПГМУ им. академика Е.А. Вагнера Минздрава РФ, Пермь, Россия;

Кадочникова Я. А., студентка биологического факультета ФГБОУ ВПО Пермский государственный научно-исследовательский университет, Пермь, Россия;

Черешнева М. В., д.м.н., профессор, гл.н.с. Института иммунологии и физиологии УрО РАН, Екатеринбург, Россия;

Черешнев В. А., д.м.н., профессор, академик РАН, гл.н.с. Института иммунологии и физиологии УрО РАН, Екатеринбург, Россия.

Миелопептиды (МП) представляют собой низкомолекулярные пептиды костномозгового происхождения. Выделяют шесть основных фракций МП, которые отличаются друг от друга аминокислотной последовательностью и вызываемыми ими эффектами. Так, МП-1 проявляет

иммунорегуляторные свойства, восстанавливает баланс между различными субпопуляциями Т-лимфоцитов. МП-2 способствует восстановлению нарушенных функций Т-лимфоцитов при опухолевых процессах. МП-3 — стимулирует фагоцитарную активность макрофагов. МП-4 и МП-6 обладают дифференцировочной активностью в отношении лейкоцитов [3, 4]. Однако роль миелопептидов в регуляции стрессорных воздействий изучена недостаточно.

Цель работы — изучение влияния миелопептидов МП-5 и МП-6 на различные показатели функциональной активности перитонеальных макрофагов в условиях различных типов стресса.

Объектом исследования в эксперименте *in vivo* служили белые беспородные мыши (самцы) массой тела 17–22 г.

В качестве стрессорного воздействия использовались: 2- и 6-часовой иммобилизационный стресс, а также 10 мин переохлаждение при $t = -20^\circ\text{C}$. Пептиды МП-5 или МП-6 вводили внутривентриально за 30 мин до стрессорного воздействия в дозе 40 мкг/кг. Животные были разделены на 4 группы: 1 — контрольная (интактные мыши); 2 — стресс; 3 — стресс + МП-5 или МП-6; 4 — введение МП-5 или МП-6 без стрессорного

воздействия. По окончании действия стресса животных декапитировали под эфирным наркозом. Выделение перитонеальных макрофагов у мышей проводилось стандартным методом. Оценку продукции активных форм кислорода перитонеальными клетками производили с помощью реакции люминолзависимой хемиллюминесценции (ЛЗХЛ). В качестве индуктора ЛЗХЛ использовали опсонизированный зимозан в концентрации 150 мкг/мл, в качестве маркера выраженности реакции ЛХЗЛ — люминол в концентрации 10^{-5} М. Результаты регистрировали в течение 1 ч каждые 5 мин с помощью многофункционального спектрофотометра (“Tecan Trading AG”, Швейцария).

Для оценки продукции цитокинов перитонеальные макрофаги культивировали в 24-луночных планшетах (“Costar”, США). В каждую лунку помещали 10^6 клеток в 1 мл приготовленной *ex tempore* полной культуральной среды на основе RPMI 1640 (Gibco, “ThermoFisher Scientific”, США), содержащей 10 мМ HEPES (“Sigma-Aldrich”, США), 2 мМ L-глутамин (“Sigma-Aldrich”), 100 мкг/мл пенициллина, 100 ед/мл стрептомицина и 10% ЭТС (“Биолот”, Россия). В качестве индуктора продукции провоспалительных цитокинов использовали опсонизированный зимозан в концентрации 150 мкг/мл.

Количественное определение IL-1 β , TNF- α , IL-12 и IL-10 проводили методом твердофазного иммуноферментного анализа с помощью наборов (“R&D”, США) согласно методике, предложенной производителем.

Оценку апоптоза клеток перитонеального смыва проводили на проточном цитофлуориметре. Окраску клеток проводили с использованием коммерческого набора реагентов аннексина-FITC и 7AAD согласно инструкции производителя (Beckman Coulter, США). Определение доли клеток, экспрессирующих фосфатидилсерин, осуществляли на проточном цитофлуориметре FACSCalibur (Becton Dickinson, США). Статистический анализ проводили с помощью непарного t-критерия Стьюдента.

В результате проведенных экспериментов установлено, что иммобилизационный стресс не влиял на спонтанную продукцию активных форм кислорода перитонеальными макрофагами. Изолированное введение животным миелопептида МП-5 стимулировало спонтанную продукцию активных форм кислорода макрофагами. Однако при введении МП-5 на фоне иммобилизационного стресса, изменений спон-

танной продукции активных форм кислорода макрофагами зарегистрировано не было. В группах животных на фоне изолированного введения МП-6 не было выявлено изменений спонтанной продукции кислородных радикалов макрофагами. При анализе стимулированной ЛЗХЛ было установлено, что стресс угнетал продукцию активных форм кислорода в зимозан стимулированных культурах, а МП-5 и МП-6 отменяли эффект стресса.

Введение мышам МП-5 и МП-6 также отменяло стресс-индуцированное угнетение IL-1 β при иммобилизационном стрессе и нивелировало усиление продукции IL-10 на фоне 10 мин холодового стресса. На апоптоз клеток перитонеального смыва и продукцию кортикостерона при стрессе миелопептиды влияния не оказывали.

Таким образом, миелопептиды МП-5 и МП-6 оказывали корригирующий эффект на функции перитонеальных макрофагов.

Ранее было показано, что аналогичным действием по отношению к продукции кислородных радикалов и IL-1 β обладал МП-3 [1], а МП-1 оказывал модулирующее влияние на пролиферацию клеток селезенки мышей в модели иммунодефицитного состояния [3]. В системе *in vitro* было выявлено активирующее действие на спонтанную продукцию IL-1 β для МП-3, 5, 6 [2]. Таким образом, полученные нами данные указывают на перспективность дальнейшего исследования иммунокорригирующего влияния МП-5, МП-6 и других миелопептидов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Гейн С. В., Гаврилова Т. В., Журавлёва Л. С., Черешнева М. В., Кирилина Е. А., Черешнев В. А. // Доклады Академии наук. 2014. 455(2). 232–234. [Gein S. V., GavriloVA T. M., Zhuravleva L. S., ChereshneVA M. V., Kirilina E. A., Chereshnev V. A. // DoClady Academy of Sciences, 2014, 455(2), 232–234].
2. Гейн С. В., Гаврилова Т. В., Черешнев В. А., Черешнева М. В. // Цитокины и воспаление. 2008. 7(1). 24–28. [Gein S. V., GavriloVA T. M., Chereshnev V. A., ChereshneVA M. V. // Cytokines and inflammation, 2008, 7(1). 24–28.].
3. Петров Р. В., Михайлова А. А., Фомина Л. А., Степаненко Р. Н. Миелопептиды. — М.: Наука, 2000. 181 с. [Petrov R. V., Mikhailova A. A., Fonina L. A., Stepanenko R. N. Myelopeptides. — M.: Science, 2000, 181].
4. Руднева Т. Б., Осипова Е. Ю., Махайлова А. А., Манько В. М. Коррекция миелопептидами дифференцировки кроветворных клеток-предшественников у мышей с экспериментальным Т-иммунодефицитом // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. — 1989. — Т. 107, № 6. — с. 718–720.

[Rudneva T. B., Osipova E. Yu., Makhaylova A. A., Manko V. M. Correction of myelopeptide differentiation of hematopoietic progenitor cells in mice with

experimental T-immunodeficiency // Bulletin of experimental biology and medicine—1989.—Т. 107, № 6.—с. 718—720.].

IMMUNE MODULATING EFFECTS OF MYELOPEPTIDES MP-5 AND MP-6 UNDER THE STRESS CONDITIONS

© 2019 O. N. Gein^{5*}, T. V. Gavrilova^{1,4}, Ya. A. Kadochnikova³, M. V. Cheresheva², V. A. Chereshev²

*E-mail: gein@iegm.ru

¹Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Perm, Russia;

²FGBUN Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russia;

³Perm State Research University Perm State Medical University, Perm, Russia;

⁴FSBEI HE «Academician E. A. Wagner Perm State Medical University» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Perm, Russia;

⁵FGBOU VO Perm State Pharmaceutical Academy, Ministry of Health of the Russian Federation, Perm, Russia

Received: 06.03.2019. Accepted: 18.03.2019

The myelopeptides MP-5 and MP-6 are capable of correcting changes in the production of reactive oxygen species and cytokines (IL-1 β and IL-10) by peritoneal macrophages under stress.

Key words: myelopeptides, stress, macrophages, cytokines

Authors:

Gein O. N., ☒ candidate of Biological Sciences, Associate Professor of the Department of Pharmacology, Perm State Pharmaceutical Academy, Ministry of Health of the Russian Federation, Perm, Russia. **E-mail:** gein@iegm.ru;

Gavrilova T. V., MD, professor, leading researcher of the institute of ecology and genetics of microorganisms, ural branch of the russian academy of sciences, Head of the Department FSBEI HE «Academician E. A. Wagner Perm State Medical University» Perm, Russia;

Kadochnikova Y. A., a student of the Biology Faculty of the Perm State Research University, Perm, Russia;

Cheresheva M. V., MD, Professor, Research Fellow, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russia;

Chereshev V. A., Academician of the Russian Academy of Sciences, MD, Chief Researcher of the Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russia.

РЕГУЛЯЦИЯ β -ЭНДОРФИНОМ И ДИНОРФИНОМ А СЕКРЕТОРНОЙ АКТИВНОСТИ КЛЕТОК ПЕРИТОНЕАЛЬНОЙ ПОЛОСТИ МЫШЕЙ ПРИ СТРЕССЕ

© 2019 г. С. В. Гейн^{1,2*}

*E-mail: gein@iegm.ru

¹ФГБУН Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь, Россия;

²Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

Поступила: 25.02.2019. Принята: 12.03.2019

На фоне 2 ч иммобилизационного стресса наблюдалось снижение продукции АФК и IL-1 β клетками перитонеальной полости мышей. Предварительное введение животным β -эндорфина или динорфина А модулировало эффекты стресса.

Ключевые слова: стресс, β -эндорфин, IL-1 β , IL-10, клетки перитонеальной полости, активные формы кислорода

DOI: 10.31857/S102872210006717-3

Адрес: 614081, г. Пермь, ул. Голева 13. «Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» – филиал ФГБУН Пермского федерального исследовательского центра УрО РАН, лаборатория биохимии развития микроорганизмов. Гейн Сергей Владимирович. Тел./факс: (8342) 2108759 (сл.), 8-902-831-77-05 (моб.). E-mail: gein@iegm.ru.

Авторы:

Гейн С. В., д.м.н., заместитель директора по научной работе «ИЭГМ УрО РАН» – филиала ПФИЦ УрО РАН, Пермь, Россия; профессор кафедры микробиологии и иммунологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Пермский государственный национальный исследовательский университет», Пермь, Россия.

Опиоидные пептиды обеспечивают тесное взаимодействие между нервной и иммунной системой при стрессе [1]. Клетки врожденного иммунитета – одна из мишеней эндогенных опиоидов, которые модулируют цитокиновую секрецию, бактерицидный потенциал и процессы хемотаксиса [2]. Наши предыдущие результаты показали, что введение мышам β -эндорфина в широком диапазоне доз приводило к стимуляции секреции активных форм кислорода, при этом продукция перитонеальными фагоцитами таких цитокинов, как IL-1 β и IL-10 значительно снижалась под воздействием пептида [3].

Цель работы – изучение влияния β -эндорфина и динорфина А на стресс-индуцированную продукцию активных форм кислорода (АФК) и IL-1 β стимулированными и нестиму-

лированными перитонеальными лейкоцитами мыши *in vivo*.

Исследования были выполнены на белых беспородных мышах средней массой 25–33 г, которых содержали в условиях лабораторного вивария. Все эксперименты были проведены в соответствии с действующими рекомендациями и этическими нормами. β -эндорфин (Skytek laboratories, США) вводили однократно внутривентриально в объеме 150 мкл в дозах 100, 0.0005 мкг/кг, динорфин А 1–17 (Sigma) в дозах 1 и 0.0001 мкг/кг за 1 ч до 2 ч иммобилизации, животные контрольной группы получали физиологический раствор в аналогичном объеме. Иммобилизацию проводили в течение 2 часов, фиксируя мышью за конечности на жесткой поверхности, в положении лежа на спине. После иммобилизации всех животных выводили из эксперимента путем декапитации под эфирным наркозом. Продукцию АФК перитонеальными лейкоцитами оценивали с помощью реакции люминолзависимой хемилюминесценции (ЛЗХЛ). Количественное определение IL-1 β в супернатантах клеточных культур проводили методом твердофазного иммуноферментного анализа с помощью иммуноферментных тест-систем для мышей по методике, предложенной производителем («R&D», США). Полученный материал обрабатывали с помощью двухфактор-

ного дисперсионного анализа для непарных данных и LSD-критерия для post-hoc сравнения.

Установлено, что двухчасовой иммобилизационный стресс статистически значимо снижал спонтанную продукцию АФК лейкоцитами перитонеального смыва. Введение мышам β -эндорфина в дозе 100 мкг/кг перед иммобилизацией приводило к стимуляции секреции АФК по сравнению с животными контрольной группы. В то же время предварительное введение животным пептида в дозе 0,0005 мкг/кг с последующей иммобилизацией уровни АФК достоверно не изменяло. Изолированное введение мышам β -эндорфина в дозе 100 мкг/кг эффектов не оказывало, в то время как изолированное введение пептида в дозе 0,0005 мкг/кг приводило к выраженной стимуляции спонтанной продукции АФК по сравнению с контрольной группой в течение всего периода наблюдений. В стимулированных зимозаном культурах у мышей, подвергнутых иммобилизации, секреция АФК также снижалась. Введение животным β -эндорфина в дозе 100 мкг/кг эффекты стресса не модифицировало, а введение пептида в дозе 0,0005 мкг/кг перед стрессом приводило к усилению продукции АФК. Динорфин А нивелировал стресс-индуцированное угнетение респираторного взрыва в спонтанных и индуцированных культурах, помимо этого, изолированное введение животным пептида в низкой дозе 0,0001 мкг/кг усиливало продукцию АФК в зимозан-индуцированных пробах.

Спонтанная и стимулированная секреция IL-1 β клетками перитонеального смыва на фоне стресса статистически значимо снижалась. Предварительное введение β -эндорфина перед иммобилизацией в дозе 100 мкг/кг эффект стресса нивелировало, в то время как введение низкой дозы β -эндорфина (0,0005 мкг/кг) – приводило к еще более выраженному снижению уровней IL-1 β . На фоне введения динорфина А уровни

спонтанной продукции IL-1 β оставались низкими по отношению к животным контрольной группы, и от группы животных, подвергнутых стрессу, статистически значимых отличий не выявлено. В стимулированных культурах выраженных эффектов динорфин А не оказывал.

Таким образом, опиоидные пептиды модулируют эффекты стрессового фактора, однако направленность воздействия зависит от вводимой дозы пептида и наличия дополнительного активационного стимула. Наиболее выраженный эффект оказывала физиологическая доза β -эндорфина 0,0005 мкг/кг, что может объясняться особенностями взаимодействия пептида с опиоидными рецепторами различных типов [3], а также регуляцией β -эндорфином секреции гормонов гипоталамо-гипофизарной оси при стрессе [4, 5].

Работа выполнена в рамках государственного задания, номер государственной регистрации темы № 01201353248.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Bodnar R. Endogenous opiates and behavior: 2014 // *Peptides*. 2016. 75. 18–70.
2. Гейн С. В., Баева Т. А. Биохимия. 2011. 76(3). 379–390. [Gein S. V., Baeva T. A. Endogenous opioid peptides in regulation of innate immunity cells function. *Biochemistry (Mosc)*. 2011. 76(3). 309–19.]
3. Гейн С. В., Баева Т. А., Небогатиков В. О. // Доклады Академии наук. 2016. 469(6). 749–752. [Gein S. V., Baeva T. A., Nebogatikov V. O. Effects of β -endorphin on the production of reactive oxygen species, IL-1 β , TNF- α , and IL-10 by murine peritoneal macrophages *in vivo*. *Dokl. Biol. Sci.* 2016. 469(1). 202–205].
4. O'Connor T. M., O'Halloran D. J., Shanahan F. The stress response and the hypothalamic- pituitary- adrenal axis: from molecule to melancholia. *Oxford J. Medicine*. 2000. 93. 323–333.
5. Bilkei-Gorzo A., Racz I., Michel K., Mauer D., Zimmer A., Klingmüller D., Zimmer A. Control of hormonal stress reactivity by the endogenous opioid system. *Psychoneuroendocrinology*. 2008. 33. 425–436.

β-ENDORPHIN REGULATION OF SECRETORY ACTIVITY OF PERITONEAL CAVITY CELLS IN MICE UNDER STRESS CONDITION

© 2019 S. V. Gein^{1,2*}

*E-mail: gein@iegm.ru

¹*Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Perm, Russia;*

²*Perm State Research University, Perm, Russia*

Received: 25.02.2019. **Accepted:** 12.03.2019

It was found that the 2-h immobilization stress reduced the secretion of reactive oxygen species (ROS) and IL-1β by cells of the peritoneal cavity of mice. The introduction to mice of β-endorphin at doses of 100 and 0.0005 μg / kg before immobilization modulated the effects of stress.

Key words: stress, β-endorphin, IL-1β, IL-10, peritoneal cavity cells, reactive oxygen species

Author:

Gein S. V., doctor of medicine, deputy director for research Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Perm, Russia; professor Department of microbiology and immunology Perm State Research University, Perm, Russia.

МОНОХРОМАТИЧЕСКИЙ НЕКОГЕРЕНТНЫЙ СВЕТ ОПТИЧЕСКОГО ДИАПАЗОНА 450 нм ВЛИЯЕТ НА СОДЕРЖАНИЕ ЦИТОКИНОВ В НАЗАЛЬНЫХ СМЫВАХ У РИНОХИРУРГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ

© 2019 г. О. А. Гизингер^{1*}, А. М. Коркмазов¹, М. Ю. Коркмазов¹,
В. И. Карандашов², Е. С. Завгородний¹

*E-mail: OGizinger@gmail.com

¹Южно-Уральский государственный медицинский университет, Челябинск, Россия;

²Государственный научный центр лазерной медицины им. О. К. Скобелкина Федерального
медико-биологического агентства, Москва, Россия

Поступила: 19.02.2019 Принята: 06.03.2019

Представлены данные о содержании цитокинов ИЛ-8, ИЛ-10, ИЛ-1 α/β , ИЛ-6 в смывах со слизистой оболочки полости носа через 24 часа после оперативного вмешательства у пациентов, прооперированных по поводу искривления носовой перегородки. Показано, что у ринохирургических пациентов в первые сутки после хирургического вмешательства регистрируется дисбаланс цитокинов, состоящий в повышении количества ИЛ-8, ИЛ-1 α , ИЛ-1 β , ИЛ-10, снижении ИЛ-6. Использование монохроматического света с длиной волны 450 \pm 10 нм способствует снижению воспалительной реакции, восстановлению баланса цитокинов.

Ключевые слова: риносептопластика, носовая перегородка, цитокины

DOI: 10.31857/S102872210006716-2

Адрес: 454028 Челябинск, ул. Воровского, д. 64, ФГБУ Южно-Уральский государственный медицинский университет, Гизингер Оксана Анатольевна.
Тел./факс: +7(83512) 232 28 08, 8 919 319 46 04 (моб.).

E-mail: OGizinger@gmail.com

Авторы:

Гизингер О. А., д.б.н., профессор кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии и клинической лабораторной диагностики ФГБУ Южно-Уральский государственный медицинский университет, Челябинск, Россия;

Коркмазов М. Ю., д.м.н. профессор, зав. каф. оториноларингологии ФГБУ Южно-Уральский государственный медицинский университет, Челябинск, Россия;

Карандашов В. И., д.м.н. профессор, руководитель отделения клинической фармакологии и лазерной биотехнологии Государственного научного центра лазерной медицины им. О. К. Скобелкина Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия;

Коркмазов А. М., ассистент каф. оториноларингологии ФГБУ Южно-Уральский государственный медицинский университет, Челябинск, Россия;

Завгородний Е. С., студент лечебного факультета Южно-Уральский государственный медицинский университет, Челябинск, Россия.

ведения пациентов в раннем послеоперационном периоде – важное научное и практическое направление в оториноларингологии [1, 2]. Судьба и специфика реабилитационного периода, длительность воспалительной реакции после хирургического вмешательства определяется состоянием барьерной системы слизистой оболочки полости носа, балансом цитокинов [3]. Одним из триггерных факторов воспалительного ответа при хирургических вмешательствах является запуск про/противовоспалительного цитокинового каскада, баланс между оппозитными цитокинами регулирует исход воспалительного процесса на поверхности слизистых оболочек [4].

Цель исследования – изучить содержание цитокинов в назальных смывах у пациентов через 24 часа после оперативного вмешательства по поводу искривления носовой перегородки после воздействия некогерентным монохроматическим светом 450 \pm 10 нм.

АКТУАЛЬНОСТЬ

Способы повышения эффективности оперативных вмешательств полости носа и качества

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование включены 30 пациентов с искривлением носовой перегородки в возраст

те $30,6 \pm 5,4$ года. Хирургическое вмешательство проводилось под эндотрахеальным наркозом с дополнительной инфльтрационной анестезией слизистой оболочки перегородки носа и носовых раковин и соблюдением принципов риносинусхирургии. Пациентам, включенным в исследование проведена коррекция внутриносовых структур, с послеоперационной тампонадой носа ватно-марлевыми тампонами на 24 часа. Через 24 часа после операции тампоны убирались и проводилось воздействие некогерентным монохроматическим светом с длиной волны 450 ± 10 нм в соответствии с технологией, изложенной в Патенте на полезную модель № 182749. RU2496537. Исследование содержания цитокинов в смывах со слизистой оболочки полости носа: ИЛ-8, ИЛ-10, ИЛ-1 α/β , ИЛ-6 были проведены до начала операции, через 24 часа после ее завершения. В качестве сравнения использованы показатели цитокинового профиля назальных смывов пациентов без искривления носовой перегородки. Содержание цитокинов определено в НИИ иммунологии ФГБОУ ВО ЮУГМУ г. Челябинска, тест-системы «НПО Вектор» (Новосибирск, Россия). Для определения концентрации цитокинов до и после оперативного вмешательства были использованы бесклеточные фракции назальных смывов. Концентрацию цитокинов вычисляли методом перерасчета на 1 г белка с учетом общего белка, определяемого биуретовым методом. Статистический анализ полученных данных проведен с использованием пакета статистических программ SPSS «Statistics» версия 17.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

После оперативного вмешательства зарегистрировано снижение концентрации ИЛ-6 в 3,2 раза по отношению к показателям до операции ($p < 0,05$), что может быть следствием угнетения продукции ИЛ-6 лимфоцитами из-за уменьшения их численности на поверхности слизистой оболочки полости носа после хирургического вмешательства. Концентрация ИЛ-10, повысилась в 2,3 раза ($p < 0,05$). По нашему мнению, повышенный уровень ИЛ-10 при сниженном содержании ИЛ-6 — есть результат ответной реакции слизистой оболочки полости носа на стресс, вызванной травмой. Через 24 часа после операции зарегистрировано повышение содержания ИЛ-1 α в 3,56 раза, ИЛ-1 β в 4,21 раза по сравнению с показателями до операции. После операции, было выявлено повышение ИЛ-8

в 4,5 раза по сравнению с показателями до операции, что может быть следствием оксидативного повреждения тканей и выделения хемоаттрактантов для ИЛ-8 [5]. Воздействие светом 450 ± 10 нм частично восстанавливает баланс про/противовоспалительных цитокинов в смывах со слизистой оболочки полости носа через 24 часа после оперативного вмешательства, что согласуется с результатами ранее проведенных исследований [5] и дает основания для включения метода фотохромотерапии в комплекс реабилитационных мер у ринохирургических больных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ/REFERENCES

1. Коркмазов М. Ю. Отдельные объективные показатели носового дыхания в лечении вазомоторного ринита у детей с применением фотохромотерапии / М. Ю. Коркмазов, А. М. Коркмазов // Вестник оториноларингологии. 2016.;81;5,31–33. [Korkmazov M. Y. Separate objective indicators of nasal breath in treatment of vasomotorial rhinitis at children with photochromotherapy use. The Messenger of otorhinolaryngology. 2016. 81.(5),31–33].
2. Коркмазов М. Ю. Теории биорезонанса и возможности его применения в ЛОР-практике. Российская оториноларингология. 2009.— 2 (39),92–96. [Korkmazov M. Y. Theories of bioresonance and possibility of its use in LOR-practice Russian otorhinolaryngology. 2009.2 (39), 92–96].
3. Гизингер, О.А., Долгушин И. И. Система провоспалительных цитокинов у женщин с урогенитальным трихомониазом. Мед. иммунология. 2005;7; 5–6, 601–604. [Gizinger O. A., Dolgushin I. I. System of Pro-inflammatory cytokines in women with urogenital trichomoniasis / Med. immunology.— 2005. 7. (5–6): 601–604].
4. Гизингер О.А., Долгушин И. И., Ишпахтина К.Г., Маркова В.А. Уровень провоспалительных цитокинов в цервикальном секрете у женщин с хламидийной инфекцией до и после терапии низкоинтенсивным лазером с переменной генерацией импульса. Мед. иммунология. 2009; 11;(4–5), 312–313. [Gizinger O. A., Dolgushin I. I., Ishpakhtina K. G., Markova V. A. The level of pro-inflammatory cytokines in cervical secretion in women with chlamydial infection before and after therapy with a low-intensity laser with variable pulse generation Med. immunology. 2009; 11; (4–5), 312–313].
5. Гизингер О.А., Долгушин И. И. Система провоспалительных цитокинов в цервикальном секрете у женщин с урогенитальным хламидиозом / О.А. Гизингер, И. И. Долгушин. Цитокины и воспаление. 2006; 5; 4, 13–16. [Gizinger O. A., Dolgushin I. I. The system of proinflammatory cytokines in cervical secretion in women with urogenital chlamydiosis. O. A. Gizinger, I. I. Dolgushin. Cytokines and inflammation. 2006. 5;4, 13–16].

A MONOCHROMATIC INCOHERENT LIGHT OF THE 450 NM OPTICAL RANGE AFFECTS THE CONTENT OF CYTOKINES IN THE MAXILLARY WASHES IN RHINOLOGIC PATIENTS

© 2019 O. A. Gizinger^{1*}, A. M. Korkmazov¹, M. Yu. Korkmazov¹, V. I. Karandashov², E. S. Zavgorodniy¹

*E-mail: OGizinger@gmail.com

¹South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russia;

²State Research Center for Laser Medicine. O.K. Skobelkin Federal Medical-Biological Agency, Moscow, Russia

Received: 19.02.2019 . **Accepted:** 06.03.2019

The data on the content of cytokines IL-8, IL-10, IL-1, IL-6 in washes from the mucous membrane of the nasal cavity 24 hours after surgery in patients operated on for the curvature of the nasal septum are presented. The results of the study showed that in rhinosurgical patients on the first day after surgery, an imbalance of cytokines is recorded, consisting in increasing the amount of IL-8, IL-1 α , IL-1 β , IL-10, and the content of IL-6 decreases. The use of monochromatic light with a wavelength of 450 \pm 10 nm helps to reduce the inflammatory response, edema, restore the balance of cytokines.

Key words: rhinoseptoplasty, nasal septum, cytokines

Authors:

Gisinger O. A.,  Doctor of Biological Sciences, Professor of the Department of Microbiology, Virology, Immunology and Clinical Laboratory Diagnostics, FSBI South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russia. **E-mail:** OGizinger@gmail.com;

Korkmazov M. Yu., Ph.D. professor, Department Otorhinolaryngology South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russia;

Karandashov V. I., Ph. D. Professor, and Head of the Department of Clinical Pharmacology and Laser Biotechnology of the State Scientific Center for Laser Medicine named. O. K. Skobelkin Federal Medical-Biological Agency, Moscow, Russia;

Korkmazov A. M., Assistant Kaf. Otorhinolaryngology South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russia;

Zavgorodniy E. S., student of the medical faculty of the South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russia.

ОСОБЕННОСТИ ИММУННЫХ МЕХАНИЗМОВ РЕГУЛЯЦИИ РЕМОДЕЛИРОВАНИЯ ХРЯЩЕВОЙ И КОСТНОЙ ТКАНЕЙ ПРИ РАННИХ И ПОЗДНИХ ПРОЯВЛЕНИЯХ ПЕРВИЧНОГО И ПОСТТРАВМАТИЧЕСКОГО ОСТЕОАРТРОЗА

© 2019 г. Е. В. Гладкова

E-mail: gladckowa.katya@yandex.ru

*НИИ травматологии, ортопедии и нейрохирургии ФГБОУ ВО «Саратовский ГМУ
им В. И. Разумовского» Минздрава России, Саратов, Россия*

Поступила: 28.02.2019. Принята: 14.03.2019

Изучен состав лимфоцитов крови, содержание в сыворотке крови Serum CrossLaps и концентрации Urine CartiLaps в моче у 20 здоровых лиц и 74 пациентов обоего пола в возрасте $45,9 \pm 11,4$ лет с ранними (0–I ст.) и поздними (III–IV ст.) стадиями первичного и посттравматического остеоартроза. Выявлено повышение Serum CrossLaps и Urine CartiLaps при 0–I и III–IV стадиях первичного остеоартроза и при III–IV стадиях посттравматического остеоартроза, снижение содержания Т-лимфоцитов за счет ($CD3^+CD4^+$) и ($CD3^+CD8^+$) популяций лимфоцитов. Обнаружены отрицательные корреляционные связи ($p < 0,05$) средней силы ($R = -0,66$) между ($CD3^+CD4^+$)-лимфоцитами и Urine CartiLaps, а также между ($CD3^+CD8^+$)-клетками ($R = -0,70$) и (Serum CrossLaps) при III–IV стадиях первичного и посттравматического остеоартроза. Выводы: ранние стадии первичного остеоартроза отличались от посттравматического наличием признаков дезорганизации хрящевой и костной тканей. III–IV стадии первичного и посттравматического остеоартроза характеризовались потерями коллагена I-го и II-го типов и признаками депрессии Т-клеточных иммунных реакций, что подтвердило наличие отдельных аспектов общности патогенетических механизмов регуляции ремоделирования костной и хрящевой тканей при поздних стадиях остеоартроза.

Ключевые слова: остеоартроз, клеточный иммунитет, ремоделирование хрящевой и костной тканей

DOI: 10.31857/S102872210006715-1

Адрес: 410002 Саратов, ул. Чернышевского, д. 148, НИИ травматологии, ортопедии и нейрохирургии ФГБОУ ВО «Саратовский ГМУ им В. И. Разумовского» Минздрава России, отдел фундаментальных и клинико-экспериментальных исследований. Гладкова Екатерина Вячеславовна. Тел/факс +7 (8452) 393202, 89093377357 (моб.)

E-mail: gladckowa.katya@yandex.ru

Авторы:

Гладкова Е. В., к.б.н., начальник отдела фундаментальных и клинико-экспериментальных исследований НИИ травматологии, ортопедии и нейрохирургии ФГБОУ ВО «Саратовский ГМУ им В. И. Разумовского» Минздрава России; Саратов, Россия.

Широкая распространенность остеоартроза (ОА), являющегося хроническим полиэтиологическим прогрессирующим заболеванием [1, 2], приводящим к стойкой нетрудоспособности пациентов и снижению качества их жизни,

определяет необходимость разработки персонализированных патогенетически обоснованных диагностических и лечебных стратегий. Актуальным направлением исследований при ОА является изучение отдельных аспектов влияния клеточно-молекулярных иммунных реакций на направленность метаболических процессов в скелетных соединительных тканях.

Цель. Изучение особенностей клеточных иммунных механизмов и ремоделирования скелетных соединительных тканей при посттравматическом и первичном остеоартрозе.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Проведено обследование 74 пациентов обоего пола в возрасте $45,9 \pm 11,4$ лет, из которых 1-ую основную группу составили 20 человек с 0–I ст.,

2-ю основную группу – 20 пациентов с III–IV ст. первичного ОА, 1-ю группу сравнения – 18 человек с 0–I ст., 2-ю группу сравнения – 16 пациентов с III–IV ст. посттравматического ОА. 20 здоровых лиц вошли в группу контроля. Участникам исследования проведено фенотипирование лимфоцитов крови методом лазерной проточной цитофлуориметрии, используя цитометр BD FACSCantoII (США) и наборы BD Multitest 6-Color TBNK Reagent (BD, США) с количественной оценкой (cell/ μ L) субпопуляций клеток, экспрессирующих основные кластеры дифференцировки (CD). Особенности метаболизма хрящевой и костной ткани изучены на основании определения методом ИФА содержания Urine CartiLaps (CTX II) EIA в моче и Serum CrossLaps (Elisa) в сыворотке крови. Результаты исследования обработаны непараметрическими методами с применением критерия Вилкоксона с использованием Statistica-10.0. Корреляционный анализ проведен на основании вычисления критерия Спирмена (R).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Ранние (0–I ст.) ОА не сопровождалась изменениями количественного состава субпопуляций лимфоцитов в обеих группах. При поздних (III–IV ст.) проявлениях ОА происходило снижение ($p < 0,05$) содержания Т-лимфоцитов ($CD3^+$) у пациентов 2-й основной группы до 1269 (1203; 1355) и 2-й группы сравнения до 1318 (1258; 1376) против значений, полученных у лиц контрольной группы: 1735 (1704; 1769). Наблюдалось уменьшение в кровотоке ($p < 0,05$) клеток с фенотипом ($CD3^+CD4^+$) во 2-й основной группе до 766 (672; 786), во 2-й групп сравнения – до 826 (794; 863). У пациентов 2-й основной и 2-й группы сравнения отмечалось снижение численности популяции цитотоксических ($CD3^+CD8^+$)-лимфоцитов: 341 (357; 434) и 416 (398; 431) соответственно против нормальных значений в контрольной группе: 681 (664; 708). При оценке метаболического статуса пациентов с ОА обращало на себя внимание повышение ($p < 0,05$) содержания Serum CrossLaps до 0,421 (0,433; 0,410) нг/мл в 1-й основной группе в отличие от 1-й группы сравнения: 0,314 (0,306;

0,328) нг/мл и значений, имевшихся у здоровых лиц группы контроля: 0,280 (0,272; 0,293) нг/мл. На поздних стадиях (III–IV) как первичного, так и посттравматического ОА отмечено возрастание содержания ($p < 0,05$) по сравнению с нормальными значениями Serum CrossLaps, достигавшее 0,581 (0,491; 0,661) нг/мл во 2-й основной группе и концентрации 0,557 (0,522; 0,597) нг/мл во 2-й группе сравнения. Уровень Urine CartiLaps (CTX II) был повышен у пациентов 1-й группы до 36,4 (31,5; 38,9) нг/мл и 2-й основной групп – до 45,4 (37,3; 55,1) нг/мл, а 2-й группы сравнения – до 41,4 (38,2; 39,6) нг/мл против значений, имевшихся у пациентов 1-й группы сравнения: 28,4 (11,5; 33,2) и данных, полученных у здоровых лиц: 24,6 (19,8; 30,0) нг/мл. Выявлено наличие отрицательных связей средней силы ($R = -0,66$) между содержанием ($CD3^+CD4^+$)-лимфоцитов и Urine CartiLaps (CTX II), а также ($R = -0,7$) между численностью ($CD3^+CD8^+$)-клеток и концентрацией Serum CrossLaps при поздних проявлениях как первичного, так и посттравматического ОА.

ОБСУЖДЕНИЕ

Ранние стадии (0–I) первичного ОА отличались от посттравматического ОА более выраженными признаками дезорганизации внеклеточного матрикса хряща и деструкции костной ткани. Поздние проявления ОА характеризовались накоплением продуктов деградации коллагена I-го и II-го типов в биологических средах и появлением признаков депрессии клеточного иммунитета, охватывающей пулы ($CD3^+CD4^+$) и ($CD3^+CD8^+$)-лимфоцитов. Таким образом, были подтверждены отдельные аспекты общности патогенетических механизмов иммунной регуляции ремоделирования костной и хрящевой скелетных тканей на поздних стадиях как первичного, так и посттравматического ОА.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Glyn-Jones S., Palmer A. J. R., Agricola R., Price A. J., Vincent T. L., Weinans H., & Carr A. J. (2015). Osteoarthritis. *The Lancet*, 386(9991), 376–387.
2. Malfait A. M. (2016). Osteoarthritis year in review 2015: biology. *Osteoarthritis and Cartilage*, 24(1), 21–26.

**CHARACTERISTICS OF REMODELLING REGULATORY
IMMUNE MECHANISMS IN CARTILAGE AND BONE TISSUES
AT INCIPIENT AND LATE PRESENTATIONS OF PRIMARY
AND POST-TRAUMATIC OSTEOARTHRISIS**

© 2019 E. V. Gladkova

E-mail: gladckowa.katya@yandex.ru

*Orthopedics and Neurosurgery of Saratov State Medical University
n.a. V.I. Razumovsky, Saratov, Russia*

Received: 28.02.2019 . **Accepted:** 14.03.2019

The interrelations of lymphocyte subpopulations pattern in peripheral blood and level of cartilage (Urine CartiLaps (CTX II) and bone (Serum CrossLaps) tissue metabolic markers in biological media exemplified by 74 patients with incipient (0–I) and late (III–IV) stages of primary and post-traumatic osteoarthritis as well as 20 healthy persons aged 45.9 ± 11.4 have been studied. The activation of bone tissue destruction and cartilage extra-cellular matrix disorganization has been discovered at 0–I stages of primary OA, III–IV stages of primary and post-traumatic osteoarthritis. The evidences of immunodepression for T-cell immunity have been revealed represented by decrease of (CD3⁺CD4⁺) and (CD3⁺CD8⁺) lymphocytes. The presence ($p < 0.05$) of mean strength ($R = -0.66$) negative interrelations between (CD3⁺CD4⁺) lymphocytes and Urine CartiLaps as well as ($R = -0.70$) between (CD3⁺CD8⁺) cells and (Serum CrossLaps) at late stages of primary and post-traumatic osteoarthritis has been proven. In virtue of the obtained results the conclusion about incipient stages of primary osteoarthritis being characterized with more significant processes of cartilage extra-cellular matrix disorganization and bone tissue destruction has been drawn. III–IV stages of both primary and post-traumatic osteoarthritis are characterized with profound loss of type I and II collagen and accumulation of their degradation impurities in biological media accompanied by evidences of cell-immunity depression represented by decrease of T-lymphocytes count due to (CD3⁺CD4⁺) and (CD3⁺CD8⁺) pools. This proves the generality of pathogenetic remodelling regulatory mechanisms in bone and cartilage skeletal tissues at late presentations of the disease.

Key words: osteoarthritis, cellular immunity, cartilage and bone tissue remodeling

Author:

Gladkova E. V., Head of the Department of Fundamental, Clinical and Experimental Studies, Candidate of Biological Sciences Scientific Research Institute of Traumatology, Orthopedics and Neurosurgery of Saratov State Medical University n.a. V.I. Razumovsky, Saratov, Russia.

ВКЛАД РАЗНЫХ ТИПОВ МЕЛАТОНИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ В ГОРМОН-ЗАВИСИМУЮ РЕГУЛЯЦИЮ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ Т-ЛИМФОЦИТОВ, ПРОДУЦИРУЮЩИХ IL-17 (Th17)

© 2019 г. Н. С. Глебездина^{1*}, И. В. Некрасова¹, А. А. Олина²,
Г. К. Садыкова³

*E-mail: glebezdina_n@mail.ru

¹«Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН», Пермь, Россия;
²ФГБНУ «НИИ акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д. О. Отта»,
Санкт-Петербург, Россия;
³ФГБОУ ВО ПГМУ им. академика Е. А. Вагнера Минздрава России, Пермь, Россия

Поступила: 28.02.2019. Принята: 18.03.2019

Исследовано участие разных типов мелатониновых рецепторов в гормон-зависимой регуляции дифференцировки Т-хелперов, продуцирующих IL-17 (Th17). Показано, что в низких физиологических концентрациях мелатонин реализует эффекты через мембранные рецепторы, тогда как действие фармакологических концентраций гормона опосредуется как мембранными, так и ядерными рецепторами, и имеет дозовую зависимость.

Ключевые слова: Т-лимфоциты, Th17, мелатонин, мелатониновые рецепторы, MT1, MT2, ROR α

DOI: 10.31857/S102872210006713-9

Адрес: 614081, Пермь, ул. Голева, д. 13, «ИЭГМ УрО РАН», лаборатория иммунорегуляции. Глебездина Наталья Сергеевна. Тел./факс: +7(342) 2808431 / +7(342) 2809211

E-mail: glebezdina_n@mail.ru

Авторы:

Глебездина Н. С., к.б.н., м.н.с. лаборатории иммунорегуляции «Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН», Пермь, Россия;

Некрасова И. В., к.б.н., н.с. лаборатории иммунорегуляции «Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН», Пермь, Россия;

Олина А. А., д.м.н., заместитель директора по развитию ФГБНУ «НИИ акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д. О. Отта», Санкт-Петербург, Россия;

Садыкова Г. К., к.м.н., доцент кафедры акушерства и гинекологии ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет имени академика Е. А. Вагнера» МЗ РФ, Пермь, Россия.

Мелатонин, высоколипофильная молекула, секретируемая в основном шишковидной железой, обладает широким спектром функций, в том числе способен эффективно регулировать активность клеток иммунной системы [1]. Ранее в исследованиях *in vitro* нами была показана способность мелатонина регулировать дифференцировку интактных CD4⁺ Т-лимфоцитов

в Th17 [2]. Как и другие лимфоциты, Th17 экспрессируют на мембране два типа мелатониновых рецепторов с разной аффинностью – MT1 и MT2, а также внутриклеточный рецептор ROR α , который является одновременно одним из двух основных дифференцировочных факторов для этих клеток и через который, как предполагают, опосредуются иммуностимулирующие и противоопухолевые эффекты мелатонина [3, 4]. Задачей настоящей работы была оценка роли конкретных мелатониновых рецепторов в реализации выявленных эффектов гормона.

Объектами исследования служили лейкоциты здоровых небеременных женщин репродуктивного возраста (32,0±1,69 лет, n=20). Дифференцировку фракционированных наивных CD4⁺ Т-лимфоцитов в Th17 оценивали в 48 ч культуре по экспрессии клетками транскрипционного фактора ROR γ t проточной цитометрией, а также по продукции ключевого цитокина IL-17A методом ИФА. Источником эндогенного мелатонина, уровень которого также устанавливали методом ИФА, служила аутологичная сыворотка крови. Экзогенный гормон исполь-

зовали в фармакологических концентрациях 0,5 и 5 нг/мл [5]. Вклад мелатониновых рецепторов в реализацию эффектов гормона определяли с использованием для мембранных рецепторов соответствующих антагонистов – неселективного (лузиндол – для MT1/MT2) и селективного (4-P-PDOT – для MT2), а для ядерного мелатонинового рецептора RORa – малых интерферирующих РНК (siRNA: трех типов RORa-специфичных siRNA и скремблированной siRNA в качестве негативного контроля). Статистический анализ проводили с использованием парного *t*-критерия Стьюдента.

Внесение неселективного блокатора мембранных мелатониновых рецепторов отменяло стимулирующее действие эндогенного гормона при анализе как содержания CD4⁺RORγ⁺ Т-клеток (контроль – 2,55±0,18, с блокадой лузиндолом – 1,60±0,18, *p*<0,05), так и уровня IL-17A (контроль – 281,07±113,91, с блокадой лузиндолом – 199,74±89,52, *p*<0,05). Уровень эндогенного мелатонина в сыворотке составлял 27,10±7,59 пг/мл.

Внесение блокаторов мембранных мелатониновых рецепторов отменяло стимулирующее действие экзогенного мелатонина при анализе уровня IL-17A. Эффект был более выраженным при неселективной блокаде MT1/MT2 (содержание IL-17A, пг/мл, при концентрации мелатонина 0,5 нг/мл: контроль – 1672,39±252,21, с блокадой MT1/MT2 (лузиндол) – 906,58±167,31, *p*<0,05; при концентрации мелатонина 5 нг/мл: контроль – 1613,91±279,35, с блокадой MT1/MT2 (лузиндол) – 895,78±204,60, с блокадой MT2 (4-P-PDOT) – 1034,32±243,04, *p*<0,05). По-видимому, это связано с тем, что мелатонин реализует свое действие в большей степени через MT1 рецептор, поэтому 4-P-PDOT, имеющий значительно более высокое сродство к MT2 рецептору (>300 раз), оказывал влияние в меньшей степени, чем лузиндол. В изменении процентного содержания CD4⁺RORγ⁺-клеток при блокаде мембранных мелатониновых рецепторов также отмечена тенденция к снижению доли RORγ⁺-позитивных Т-лимфоцитов под воздействием как неселективного, так и селективного антагонистов для соответствующих концентраций гормона без блокаторов.

При подавлении экспрессии внутриклеточного рецептора RORa все три варианта исполь-

зованных siRNA показали свою эффективность (CD4⁺RORa⁺ клетки, %: контроль – 1,10±0,27, siRNA A – 0,77±0,16; siRNA B – 0,87±0,25; siRNA C – 0,82±0,18). На фоне подавления экспрессии RORa происходило снижение уровня CD4⁺RORγ⁺ клеток в культуре при действии экзогенного мелатонина (CD4⁺RORγ⁺ клетки, %: siRNA A контроль – 2,20±0,36, siRNA A при концентрации мелатонина 0,5 нг/мл – 1,48±0,38, *p*<0,05, siRNA A при концентрации мелатонина 5 нг/мл – 1,17±0,38, *p*<0,05). Эти данные указывают на то, что RORa-зависимые эффекты мелатонина являются стимулирующими для Th17.

Таким образом, в реализации эффектов гормона в отношении регуляции Th17 принимают участие как мембранные, так и ядерные рецепторы. Причем эффекты эндогенного гормона в низких физиологических концентрациях опосредуются MT1/MT2-сигналами, тогда как действие фармакологических концентраций экзогенного мелатонина – и MT1/MT2-, и RORa-сигналами, и имеют дозозависимость.

Исследование выполнено в рамках гранта РФФИ № 16-34-60094 мол_а_дк и государственного задания, номер госрегистрации темы: 01201353248.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Mahmood D. Pleiotropic Effects of Melatonin. *Drug Res (Stuttg)*. 2019, 69(02), 65–74.
2. Куклина Е. М., Глебездина Н. С., Некрасова И. В. Роль мелатонина в контроле дифференцировки Т-лимфоцитов, продуцирующих интерлейкин-17 (Th17). *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2015. 160; 11, 604–607. [Kuklina E. M., Glebezina N. S., Nekrasova I. V. Role of Melatonin in the Regulation of Differentiation of T Cells Producing Interleukin-17 (Th17). *Bull Exp Biol Med*. 2016. 160, 5, 656–658].
3. Jadidi-Niaragh F., Mirshafiey A. Th17 cell, the new player of neuroinflammatory process in multiple sclerosis. *Scand J Immunol*. 2011. 74(1), 1–13.
4. Slominski R. M., Reiter R. J., Schlabritz-Loutsevitch N., Ostrom R. S., Slominski A. T. Melatonin membrane receptors in peripheral tissues: distribution and functions. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2012. 351(2), 152–166.
5. Gooneratne N. S., Edwards A. Y., Zhou C., Cuellar N., Grandner M. A., Barrett J. S. Melatonin pharmacokinetics following two different oral surge-sustained release doses in older adults. *J. Pineal Res*. 2012. 52, 4, 437–445.

**CONTRIBUTION OF DIFFERENT TYPES OF MELATONINE RECEPTORS
TO HORMONE-DEPENDENT REGULATION OF T LYMPHOCYTES
PRODUCING IL-17 (TH17) DIFFERENTIATION**

© 2019 N. S. Glebezdina^{1*}, I. V. Nekrasova¹, A. A. Olina²,
G. K. Sadykova³

*E-mail: glebezdina_n@mail.ru

¹IEGM UB RAS, Perm, Russia;

²D. O. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology,
St. Petersburg, Russia;

³Perm State Medical University named after E. A. Wagner of the Ministry
of Healthcare of the Russian Federation, Perm, Russia

Received: 28.02.2019. **Accepted:** 18.03.2019

The involvement of different types of melatonin receptors in hormone-dependent regulation of the differentiation of T helpers producing IL-17 (Th17) was studied. It has been shown that in low physiological concentrations melatonin realized effects through membrane receptors, whereas the action of the hormone's pharmacological concentrations was mediated by both membrane and nuclear receptors and was dose dependent.

Key words: T lymphocytes, Th17, melatonin, melatonin receptors, MT1, MT2, RORa

Authors:

Glebezdina N. S., ✉ PhD, Junior Researcher, Laboratory of Immunoregulation, IEGM UB RAS, Perm, Russia;

E-mail: glebezdina_n@mail.ru

Nekrasova I. V., PhD, Researcher, Laboratory of Immunoregulation, IEGM UB RAS, Perm, Russia;

Olina A. A., DMedSc, Deputy Director for Development of D. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, St. Petersburg, Russia;

Sadykova G. K., PhD, Assistant Professor of the Department of Obstetrics and Gynecology, Perm State Medical University named after E. A. Wagner of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Perm, Russia.

КОМПЛЕМЕНТ ПРИ ПАТОЛОГИЯХ, ВОЗМОЖНОСТЬ КОРРЕКЦИИ С ПОМОЩЬЮ НОВОГО ГУМАНИЗИРОВАННОГО АНТИТЕЛА, БЛОКИРУЮЩЕГО АЛЬТЕРНАТИВНЫЙ ПУТЬ

© 2019 г. Н. П. Горбунов, А. В. Жахов, А. В. Трофимов,
К. А. Некрасова, С. В. Родин, Е. А. Аганесян, Е. А. Карабанова,
М. С. Захаров, А. С. Симбирцев, А. М. Ищенко*

*E-mail: a.m.ischenko@hpb.spb.ru

ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов»
Федерального медико-биологического агентства, Санкт-Петербург, Россия

Поступила: 15.03.2019. Принята: 27.03.2019

Получены два моноклональных антитела, блокирующих активацию комплемента по альтернативному пути (АП) на этапе сборки и активации C3 конвертазы. Гуманизированное антитело hC34, специфичное сайту связывания на участке $\alpha'2$ фрагмента C3c, ингибировало активацию комплемента человека на 90% *in vitro* в дозе 3 мкг/мл сыворотки крови. Антитело 3A8, специфичное C3 компоненту комплемента крысы и аналогичное антителу hC34, обладало фармакологической активностью в модели ЗЧМТ, что подтверждалось функциональным и гистологическим исследованием. Полученные результаты указывают на перспективность применения гуманизированного антитела hC34 для лечения патологий центральной нервной системы и других заболеваний с гиперактивацией комплемента.

Ключевые слова: комплемент, альтернативный путь активации комплемента, моноклональные антитела, патологии центральной нервной системы

DOI: 10.31857/S102872210006712-8

Адрес: 197110. Санкт-Петербург, ул. Пудожская, д. 7, ФГУП «Гос.НИИ особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, лаборатория биохимии белка. Ищенко Александр Митофанович. Тел./факс: +7(812) 499 16 61; +7 911 242 34 11 (моб.)

E-mail: a.m.ischenko@hpb.spb.ru; n.p.gorbunov@hpb.spb.ru

Авторы:

Горбунов Н. П., м. н. с. лаборатории биохимии белка ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия;

Жахов А. В., в. н. с. лаборатории биохимии белка ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия;

Трофимов А. В., руководитель группы лаборатории биохимии белка ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия;

Некрасова К. А., зам. начальника отдела организации НИР ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия;

Родин С. В., руководитель группы лаборатории биохимии белка ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия;

Аганесян Е. А., с. н. с. лаборатории биохимии белка ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт осо-

бо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия;

Карабанова Е. А., инженер 1 категории лаборатории биохимии белка ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия;

Захаров М. С., начальник отдела клинических исследований ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия;

Симбирцев А. С., член-корреспондент РАН, д. м. н., профессор, научный руководитель ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия;

Ищенко А. М., к. б. н., начальник лаборатории биохимии белка ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия.

Гиперактивация комплемента приводит к накоплению провоспалительных молекул анафилотоксинов C3a, C5a, опсонина C3b и других, которые, становясь источником стерильного воспаления, вносят негативный вклад в развитие множества патологий, связанных с острым и хроническим воспалением.

При неврологических заболеваниях, вовлекающих активацию системы комплемента на поврежденных тканях и клетках мозга, действие комплемента приводит к гибели нейронов, повреждению аксонов, демиелинизации и дисфункции гематоэнцефалического и гемато-спинномозгового барьеров. В этом случае, как и при других иммунологических расстройствах, ингибирование комплемента становится одной из актуальных (ведущих) терапевтических стратегий [1].

Среди различных разрабатываемых ингибиторов моноклональные антитела (МАТ), блокирующие функциональную активность комплемента, представляют повышенный интерес. С учетом сложного характера взаимодействий между компонентами и факторами СК в настоящее время разрабатывается около 20 антител, действующих на различные белки-мишени.

В качестве одного из таких МАТ нами было получено оригинальное гуманизированное антитело hC34 [2], блокирующее активацию комплемента человека по АП на этапе формирования C3-конвертазы.

Целью настоящей работы было изучение эпиптопной специфичности антитела hC34, оценка уровня его активности *in vitro*, а также получение его аналога – МАТ мыши, нейтрализующего АПК человека и крысы, и оценка эффективности его действия *in vivo*.

Для определения специфической активности hC34 активацию комплемента по АП проводили инкубацией стандартной сыворотки, содержащей 1 мг/мл компонента C3, с классическим активатором зимозаном в присутствии и в отсутствие антитела. Об уровне активации судили по концентрации полипептида C3a, который является продуктом активации C3. Было установлено, что блокирование активации на 90% достигалось при добавлении в инкубационную смесь 3 мкг hC34.

Изучение специфичности антител hC34 методами иммунохимического анализа (ИФА и иммуноблоттинг) позволило установить, что они распознают неопределяемую C3 компонента, которая формируется при гидролизе тиолэфирной связи и остается фиксированной на молекуле после ее дальнейшей трансформации и деградации в другие производные (C3i, C3b и C3c). Кроме того, в настоящей работе показано, что антитело hC34 и его Fab-фрагмент формируют устойчивый комплекс с фрагментами C3b и C3c и не взаимодействуют с нативным C3. Для поиска фрагмента, несущего сайт связыва-

ния с антителом, изучали белок, адсорбированный на колонке с иммобилизованным hC34, используя методы электрофореза в ПААГ, ВЭЖХ и масс-спектрометрии, и установили, что сайт связывания с антителом локализуется на α '2-фрагменте C3c молекулярной массой 39 кДа.

С целью исследования эффективности блокирования АПК при патологиях *in vivo* были получены МАТ 3A8 мыши к C3 компоненту комплемента крысы. Антитело по своим свойствам было близко к hC34, т.к. обладало способностью блокировать АПК и крысы, и человека.

Эффективность действия антитела была изучена на модели ЗЧМТ, вызванной у крыс дозированным ударом падающего груза. Эффективность действия антитела оценивали по массовому коэффициенту головного мозга, отражающему интенсивность воспалительной реакции в ответ на повреждение, сопровождающейся отеком; по когнитивной функции экспериментальных животных в тесте условного рефлекса пассивного избегания (УРПИ) с использованием аппаратно-программного комплекса «Шелтер» (ООО «Нейроботикс», Россия), а также путем гистологического исследования отделов головного мозга.

Показано, что применение антитела 3A8 сопряжено с дозозависимым снижением массовых коэффициентов мозга животных, получавших изучаемое антитело на фоне черепно-мозговой травмы, до уровня данного показателя у интактных животных.

Анализ сохранности УРПИ (интерпретируемой как сохранение когнитивных функций экспериментальных животных) показал, что в обеих экспериментальных группах, получавших изучаемый препарат, сохранность рефлекса составила 100%, что было на 30% выше, чем в группе контрольных животных, получавших ЗЧМТ, и указывало на четкую тенденцию к сохранению памятного следа у животных экспериментальных групп.

Гистологический анализ показал, что после травмы у животных наблюдали периваскулярные кровоизлияния и инфильтрацию лейкоцитами, вазоспазм, отек, полнокровие сосудов. У животных опытных групп, получавших препарат в дозах 125 и 250 мг/кг, было выявлено лишь небольшое полнокровие сосудов и очаги отека ткани. Помимо этого в ряде случаев у животных контрольной группы наблюдали очаговые кровоизлияния в толще мозговых оболочек; у животных опытных групп состояние мозговых оболочек было нормальным. Кроме того, гистологический анализ показал, что введение пре-

парата снизило выраженность картины ЗЧМТ, а также достоверно и дозозависимо снизило процент погибших нейронов в гипоталамусе.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что блокирование компонента по АП с помощью полученных нейтрализующих антител приводит к положительному терапевтическому эффекту, что позволяет рассматривать гуманизированные антитела hC34 в качестве инновационного терапевтического средства для лечения патологий ЦНС и других патологий, связанных с неконтролируемой активацией компонента.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ/REFERENCES

1. Ricklin D., Mastellos D. C., Reis E. S., Lambris J. D. The renaissance of complement therapeutics. *Nat Rev Nephrol.* 2018 Jan, 14(1), 26–47.
2. Пат. РФ № 2630647: C07K 16/18, C12N15/00, A61K 39/395 / Картузова В. Е., Трофимов А. В., Ищенко А. М., Родин С. В., Жахов А. В., Симбирцев А. С., Климов Н. А., Петров А. В., Карасев М. М. – заявка 2016120997; опубли. 11.09.2017, Бюл. № 26 [Pat. 2630647 Russian Federation: C07K 16/18, C12N15/00, A61K 39/395 / Kartuzova V. E., Trofimov A. V., Ischenko A. M., Rodin S. V., Zhahov A. V., Simbirtsev A. S., Klimov N. A., Petrov A. V., Karasev M. M. – Application 2016120997; Publ. 11.09.2017, Bul. № 26].

COMPLEMENT IN PATHOLOGIES, POSSIBILITY OF CORRECTION USING A NOVEL HUMANIZED ANTIBODY THAT CAN BLOCK ALTERNATIVE PATHWAY OF COMPLEMENT SYSTEM ACTIVATION

© 2019 N. P. Gorbunov, A. V. Zhakhov, A. V. Trofimov, K. A. Nekrasova, S. V. Rodin, E. A. Atanesyan, E. A. Karabanova, M. S. Zakharov, A. S. Simbirtsev, A. M. Ischenko*

*E-mail: a.m.ischenko@hpb.spb.ru

State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Saint Petersburg, Russia

Received: 15.03.2019. Accepted: 27.03.2019

Two monoclonal antibodies were developed and were shown to block the complement system alternative pathway (AP) activation at the stage of assembly and activation of C3 convertase. The humanized antibody hC34 specific to a binding site on $\alpha'2$ determinant of C3c fragment inhibited *in vitro* the human complement activation by 90% at a dose of 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of blood serum. The antibody 3A8 specific to rat complement C3 component and similar to antibody hC34 was demonstrated to be pharmacologically active in model of closed craniocerebral injury (data of functional and histological studies). The results of this study indicate the humanized antibody hc34 to be promising for treatment of central nervous system pathologies and of other diseases associated with complement hyperactivation.

Key words: complement, alternative pathway of complement system activation, monoclonal antibodies, central nervous system pathologies

Authors:

Gorbunov N. P., Junior Researcher, Laboratory of Protein Biochemistry, State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Saint Petersburg, Russia;

Zhakhov A. V., Leading Researcher, Laboratory of Protein Biochemistry, State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Saint Petersburg, Russia;

Trofimov A. V., Group Leader, Laboratory of Protein Biochemistry, State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Saint Petersburg, Russia;

Nekrasova K. A., Deputy Head of R&D Department, State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Saint Petersburg, Russia;

Rodin S. V., Group Leader, Laboratory of Protein Biochemistry, State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Saint Petersburg, Russia;

Atanesyan E. A., Senior Researcher, Laboratory of Protein Biochemistry, State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Saint Petersburg, Russia;

Karabanova E. A., Engineer, Laboratory of Protein Biochemistry, State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Saint Petersburg, Russia;

Zakharov M. S., Head of Department of Preclinical Studies, State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Saint Petersburg, Russia;

Simbirtsev A. S., RAS Corresponding Member, MD, Professor, Scientific Supervisor of State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Saint Petersburg, Russia;

Ischenko A. M., ☒ PhD, Head of Laboratory of Protein Biochemistry, State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Saint Petersburg, Russia. E-mail: a.m.ischenko@hpb.spb.ru

СОСТОЯНИЕ ЛОКАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА У ПОДРОСТКОВ С ХРОНИЧЕСКИМ ГИНГИВИТОМ

© 2019 г. О. Ю. Дзех^{1*}, А. И. Лазарев²

*E-mail: denitayana@yandex.ru

¹ФГАОУ ВО «Белгородский национальный исследовательский университет», Белгород, Россия;

²ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, Курск, Россия

Поступила: 28.02.2019. Принята: 15.03.2019

Под наблюдением находились подростки с хроническим катаральным гингивитом в возрасте в возрасте от 14 до 17 лет без общесоматической патологии, влияющей на этиопатогенез воспалительных заболеваний пародонта. Из общего числа обследованных пациентов 19 человек находилось на этапе ортодонтического лечения. Контрольную группу составили 40 клинически здоровых пациентов. Состояние местного иммунного статуса полости рта оценивали по функциональной активности фагоцитов, содержанию в смешанной слюне IgA, IgM, IgG, sIgA, ИЛ-4, ИЛ-8 методом твердофазного иммуноферментного анализа. У подростков с хроническим гингивитом имеют место четко выраженные сдвиги локального иммунитета, которые представлены увеличением содержания IgG, sIgA, ИЛ-4, ИЛ-8, функционального резерва нейтрофилов, индекса стимуляции нейтрофилов по сравнению с группой контроля, а также снижением уровня IgM и концентрации кислородзависимых ферментов в цитоплазме фагоцитов в НСТ-спонтанном тесте.

Ключевые слова: локальный иммунитет, хронический гингивит

DOI: 10.31857/S102872210006711-7

Адрес: 308015, Белгород, ул. Победы, 85, ФГАОУ ВО «Белгородский национальный исследовательский университет», Дзех Ольга Юрьевна. Тел.: 8 910 314-67-07.

E-mail: denitayana@yandex.ru

Авторы:

Дзех О. Ю., соискатель кафедры фармакологии ФГАОУ ВО «Белгородский национальный исследовательский университет», Белгород, Россия;

Лазарев А. И., д.м.н., профессор кафедры оториноларингологии ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» Минздрава России, Курск, Россия.

Эпидемиологические данные свидетельствуют о массовой распространенности гингивита у подростков, достигающей в различных регионах 83%-99%. В патогенезе хронического гипертрофического гингивита существенную роль играют иммунные и гормональные сдвиги, способствующие пролиферации соединительной ткани в десне и обуславливающие вследствие этого гиперплазию десны в целом. Подростковые гингивиты обусловлены приобретением резидентной микрофлорой патогенных свойств в результате снижения местного иммунитета [1].

Целью исследования стало изучение локального иммунитета полости рта у подростков с хроническим гингивитом.

ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ МЕТОДЫ

Под наблюдением находилось 84 подростка в возрасте от 14 до 17 лет, из них 59 девушек (70,2%) и 25 юношей (29,8%) без общесоматической патологии, влияющей на этиопатогенез воспалительных заболеваний пародонта. Из общего числа обследованных пациентов 19 человек (22,6%) находилось на этапе ортодонтического лечения. Контрольную группу составили 40 клинически здоровых пациентов.

Всем пациентам проведено комплексное клинико-рентгенологическое обследование состояния тканей пародонта, в результате которого 54 пациентам (64,3%) был поставлен диагноз хронический генерализованный катаральный гингивит, а 30 пациентам (35,7%) — хронический генерализованный гипертрофический гингивит.

При проведении клинических исследований были соблюдены этические нормы, изложенные в Хельсинской декларации 1964 года, модифицированной 41 Всемирной ассамблеей, Гонконг, 1989. От каждого пациента было получено информированное согласие.

Состояние местного иммунного статуса полости рта оценивали по содержанию в смешанной

слоне IgA, IgM, IgG, sIgA, ИЛ-4, ИЛ-8 методом твердофазного иммуноферментного анализа. Функциональная активность нейтрофилов, оценивалась по активности фагоцитоза – проценту активных фагоцитов из числа сосчитанных нейтрофилов. Метаболическая активность фагоцитов оценивалась в тесте восстановления нитросинего тетразолия. Рассчитывался индекс стимуляции нейтрофилов (ИСН). Функциональный резерв нейтрофилов определялся как разница между диформаза-позитивными клетками в стимулированной реакции и диформаза-позитивными клетками в спонтанной реакции НСТ-теста.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

У пациентов с хроническим гингивитом до лечения установлено повышение концентрации IgG, что указывает на активацию гуморального иммунитета в ответ на ранее известный антиген, увеличение содержания sIgA определено как защитный механизм на повреждение слизистой полости рта, с целью создания барьера для патогенных микроорганизмов. При этом уровень IgM был снижен. Данный факт можно объяснить коротким временным промежутком для синтеза достаточного количества такой большой молекулы. Концентрация IgA оставалась без изменений, так как молекула этого иммуноглобулина основную роль играет в плазме крови, а не в полости рта.

Что касается состояния фагоцитов ротовой полости, то у пациентов с хроническим гингивитом до лечения практически не отличалась от данных группы контроля. В отношении концентрации кислородзависимых ферментов в цитоплазме фагоцитов в НСТ-спонтанном тесте, то до лечения у пациентов их уровень был ниже контрольных данных. Иная картина в отношении другого показателя активности кислородзависимых ферментов в цитоплазме фагоцитов НСТ-стимулированного теста – данные до лечения практически не отличались от контрольных показателей. На наличие развитого воспалительного процесса у пациентов до лечения указывает достоверно высокие значения интегральных показателей кислородзависимой бактерицидной активности – функционального резерва нейтрофилов и индекса стимуляции нейтрофилов.

Таким образом, у подростков с хроническим гингивитом имеют место четко выраженные сдвиги локального иммунитета, которые представлены увеличением содержания IgG, sIgA, ИЛ-4, ИЛ-8, функционального резерва нейтрофилов, индекса стимуляции нейтрофилов по сравнению с группой контроля, а также снижением уровня IgM и концентрации кислородзависимых ферментов в цитоплазме фагоцитов в НСТ-спонтанном тесте. Исходя из полученных данных, можно считать перспективным в дальнейшем проведение исследований, касающихся целесообразности использования в комплексном лечении подростков с хроническим гингивитом, наряду с общепринятыми средствами, иммунокорректирующих препаратов, что может положительно сказаться на состоянии местного иммунитета и эффективность лечения [2, 3].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Локтионов А. Л., Конопля А. И., Лунев М. А., Караулов А. В. Иммунные и оксидантные нарушения в патогенезе воспалительных заболеваний пародонта. Иммунология. 2015, 36(5), 319–328. [Loktionov A. L., Konoplya A. I., Lunev M. A., Karaulov A. V. Immune and oxidant disorders in the pathogenesis of inflammatory parodontal diseases. Immunology. 2015, 36 (5), 319–328].
2. Успенская М. Н., Конопля А. И., Локтионов А. Л. Коррекция иммунометаболических нарушений при хроническом генерализованном пародонтите с использованием гепона, гипоксена и фосфоглива форте. Системный анализ и управление в биомедицинских системах. 2012, 4(11), 908–913. [Uspenskaya M. N., Konoplya A. I., Loktionov A. L. Correction of the immune and metabolic disorders in chronic generalized parodontitis using Gepon, Hypoxen and Phosphogliv Forte. System analysis and control in biomedical systems. 2012, 4(11), 908–913].
3. Юдина Н. А., Ирышкова О. В., Лунев М. А., Успенская М. Н., Блеканова В. А. Недостаточная эффективность стандартного лечения в коррекции иммунометаболических нарушений при хроническом катаральном генерализованном гингивите, генерализованном пародонтите и одонтогенном остеомиелите челюстно-лицевой области. Фундаментальные исследования. 2012, 7(1), 204–207. [Yudina N. A., Ryshkova O. V., Lunev M. A., Uspenskaya M. N., Blekanova V. A. Lack of efficiency of standard treatment in correction of immune and metabolic disorders in chronic catarrhal generalized gingivitis, generalized periodontitis and odontogenic osteomyelitis of the maxillofacial region. Fundamental study. 2012, 7(1), 204–207].

THE STATE OF LOCAL IMMUNITY IN ADOLESCENTS WITH CHRONIC GINGIVITIS

© 2019 O. Yu. Dzech^{1*}, A. I. Lazarev²

*E-mail: sh.77@mail.ru

¹Belgorod State University, Belgorod, Russia;

²Kursk State Medical University, Kursk, Russia

Received: 28.02.2019 Accepted: 15.03.2019

Adolescents with chronic catarrhal gingivitis aged from 14 to 17 years without general somatic pathology affecting the etiopathogenesis of inflammatory periodontal diseases were observed. Of the total number of patients examined, 19 were at the stage of ortho-dontic treatment. The control group consisted of 40 clinically healthy patients. The state of the local immune status of the oral cavity was assessed by the functional activity of phagocytes, the content of mixed saliva IgA, IgM, IgG, sIgA, IL-4, IL-8 by solid-phase enzyme immunoassay. In adolescents with chronic gingivitis, there are clearly pronounced shifts in local immunity, which are represented by an increase in the of IgG, sIgA, IL-4, IL-8, the functional reserve of neutrophils, index stimulation of neutrophils compared to the control group, as well as a decrease in the level of IgM and the concentration of oxygen-dependent enzymes in the cytoplasm of phagocytes in the nbt-spontaneous test.

Key words: local immunity, chronic gingivitis

Authors:

Dzech O. Yu., ✉ Postgraduate Student, Department of Pharmacology of Belgorod State University, Belgorod, Russia

E-mail: sh.77@mail.ru;

Lazarev A. I., M.D., Department of Otorhinolaryngology of Kursk State Medical University of the Ministry of Health of Russia, Kursk, Russia.

ТУЧНЫЕ КЛЕТКИ В СИСТЕМЕ РЕГУЛЯЦИИ МАТКИ КРЫС

© 2019 г. С. В. Диндяев^{1*}, Ф. А. Ромашин¹, Д. В. Касаткин²

*E-mail: dindyaev@mail.ru

¹ФГБОУ ВО «Ивановская государственная медицинская академия»
Минздрава РФ, Иваново, Россия;

²ОБУЗ «Городская клиническая больница № 7», Иваново, Россия

Поступила: 12.03.2019. Принята: 25.03.2019

С помощью флуоресцентно-гистохимических методов исследованы динамика плотности пространственного распределения тучных клеток тела матки крыс и содержание в них катехоламинов, серотонина и гистамина в течение полового цикла, беременности и послеродового периода. При изменениях функционального состояния матки линейная зависимость содержания серотонина и катехоламинов в тучных клетках сохраняется на высоком уровне (в течение полового цикла, беременности) или быстро восстанавливается (в ходе послеродовой инволюции). Рассматривается участие тучных клеток в восстановлении симпатической иннервации матки после родов. Предполагается ведущая роль тучных клеток в паракринной регуляции процессов морфогенеза тканей матки.

Ключевые слова: тучные клетки, матка, половой цикл, беременность, послеродовый период, биогенные амины

DOI: 10.31857/S102872210006707-2

Адрес: 153012, Ивановская область, Иваново, Шереметевский проспект, 8, Диндяев С. В. Тел. 89106986843 (моб.).

E-mail: dindyaev@mail.ru

Авторы:

Диндяев С. В., д.м.н., доцент, заведующий кафедрой гистологии, эмбриологии, цитологии ФГБОУ ВО «Ивановская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Иваново, Россия;

Ромашин Ф. А., ассистент кафедры кафедрой гистологии, эмбриологии, цитологии ФГБОУ ВО «Ивановская государственная медицинская академия» Минздрава России, Иваново, Россия;

Касаткин Д. В., врач урологического центра областного бюджетного учреждения здравоохранения «Городская клиническая больница № 7» города Иваново, Иваново, Россия.

Для матки женщин детородного периода характерны процессы постоянного ремодулирования тканей, определяющего ее морфофункциональное состояние в течение полового цикла, беременности и в послеродовом периоде. Эффективность этих процессов во многом обеспечивается иммунорегуляторными механизмами, важную роль в которых играют тучные клетки, содержащие в своей цитоплазме моноамины — гистамин, серотонин, катехоламины [1, 2, 3].

Цель работы: дать морфофункциональную характеристику пространственного распределения тучных клеток тела матки крыс и содержания в них катехоламинов, серотонина и гистамина в течение полового цикла (120 животных), беременности (90 животных) и в послеродовый период (55 животных).

Методы исследования: 1) параформальдегидный метод Фалька-Хилларпа в модификации Е. М. Крохиной для выявления катехоламинов и серотонина в тучных клетках в нефиксированных криостатных срезах тела матки; 2) флуоресцентно-гистохимический метод Кросса-Эвана-Роста с использованием ортофталевого альдегида (фирма «MERCK-Schuchardt») для дифференцировки гистамина в тучных клетках; 3) окраска криостатных срезов альциановым синим-сафранином в прописи Дезага для выявления гликозаминогликанов в тучных клетках [2]. Криостатные срезы изучались с помощью люминесцентного микроскопа ЛЮМАМ-ИЗ с фотометрической насадкой ФМЭЛ-1А. Концентрацию биоаминов определяли в условных единицах шкалы регистратора. Для выявления и анализа

сопряжений изменения параметров в динамике физиологических процессов применялись линейный корреляционный анализ Пирсона (r) и ранговый корреляционный анализ Спирмена (R).

В течение полового цикла плотность пространственного распределения флуоресцирующих тучных клеток (ТК) в эндометрии минимальна в метаэструс, максимальна – в поздний диэструс. Наименьшее количество флуоресцирующих ТК в мышечной оболочке матки отмечается в ранний эструс, наибольшее – в проэструс. Наибольшая концентрация исследуемых биоаминов в ТК всех оболочек отмечается в проэструс. Минимум этих показателей отмечается в поздний эструс и метаэструс.

Во время беременности наибольшая концентрация серотонина и катехоламинов в ТК отмечается на 15–16-е и 21-е сутки. Минимум этих показателей имеет региональные различия: в эндометрии и периметрии тела матки он отмечается на 20-й день, а в миометрии на 4-й день беременности. Максимальное содержание гистамина в ТК эндометрия и периметрия приходится на 21-е сутки беременности.

К 6-м суткам после родов плотность флуоресцирующих ТК в эндометрии увеличивается примерно в два раза, а в миометрии – в 4 раза ($p < 0,05$). Максимального уровня плотность достигает к 10-м суткам.

Сразу после родов уровень серотонина и катехоламинов в ТК достоверно снижается. Минимальные значения уровня моноаминов наблюдаются на 10-е сутки. В ТК мышечной оболочки содержание серотонина и катехоламинов максимально в первые сутки после родов. Постепенно снижаясь, оно достигает наименьших значений на 15-е сутки послеродовой инволюции.

Параметрический корреляционный анализ демонстрирует высокую степень положительной линейной зависимости между концентрациями серотонина и катехоламинов по точкам зондирования ($r = 0,72–0,95$) в процессе полового цикла и беременности. В послеродовом периоде наблюдается увеличение силы связи исследуемых параметров от средней ($r = 0,60–0,62$ в первые сутки) до сильной ($r = 0,74–0,82$ к 7-м суткам).

Из результатов рангового корреляционного анализа обращает внимание положительная взаимосвязь изменений содержания в ТК эндометрия и миометрия гистамина и катехоламинов ($R = 0,714–0,955$), в ТК миометрия гистамина и серотонина ($R = 0,714–0,800$).

Таким образом, в процессе реконструкции тканей при изменениях функционального состояния матки линейная зависимость содержания серотонина и катехоламинов в ТК сохраняется на высоком уровне (в течение полового цикла, беременности) или быстро восстанавливается (в ходе послеродовой инволюции), что отражает общую закономерность о равновесии процессов анаболизма-катаболизма в рамках гомеостаза клеток, тканей и органов [2, 4].

Значительное увеличение плотности ТК в ранний послеродовый период может быть связано с отсутствием в миометрии флуоресцирующих нервных волокон. Мы предполагаем, что тучные клетки способствуют восстановлению симпатической иннервации матки после родов.

Полученные данные подтверждают мнение, что ТК в матке являются основным источником гистамина и дополнительным продуцентом серотонина и катехоламинов [2]. Они также поглощают, накапливают и инактивируют излишки моноаминов, которые не были утилизированы рабочими клетками. Не исключается возможность выполнения ТК функции переносчиков биоаминов между различными оболочками.

Можно предположить ведущую роль тучных клеток в паракринной регуляции процессов морфогенеза тканей матки при изменениях ее функционального состояния.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. *Абрамченко В. В., Капленко О. В.* Адренергические средства в акушерской практике. СПб.: ТОО ТК «Петрополис», 2000. 272 с. [*Abramchenko V. V., Kaplenko O. V.* Adrenergic agents in obstetric practice. SPb.: Shopping Mall Petropolis Ltd, 2000. 272 p. In Russ.].
2. *Лычкова А. Э.* Серотонинергическая регуляция эндокринной и мочеполовой систем. М.: Изд-во РАМН, 2014. 467 с. [*Lychkova A. E.* Serotoninergetic regulation of endocrine and urogenital systems. М.: Publishing house of the Russian academy of medical science, 2014. 467 p. In Russ.].
3. *Параскун А. А., Виноградов С. Ю., Гринева М. Р.* О закономерностях изменений внутриорганного комплекса биоаминового обеспечения щитовидной железы в период формирования адаптации // Морфология. 2006. Т. 129. № 4. С. 98. [*Paraskun A. A., Vinogradov S. Yu., Grinyova M. R.* Alterations of intraorganic complex of bioamines' supply for thyroid gland while adaptation formation period: some regularities // Morphology. 2006. Vol. 129, № 4. P. 98. In Russ.].
4. *Диндяев С. В.* Внутри- и внеорганные структуры в системе биоаминового обеспечения матки // Сборник научных трудов SWorld. Материалы

международной научно-практической конференции “Современные направления теоретических и прикладных исследований 2012”. Выпуск 1. Том 30. Одесса: КУПРИЕНКО, 2012. С. 74–84. [Dindyaev S. V. Intra- and extraorgan structures in the system

of uterus bioamine supply // Collected scientific reports SWorld. Materials of the international scientific and practical conference “Modern trends of theoretical and applied research 2012”. Issue 1. Vol. 30. Odessa: KUPRIENKO, 2012. P. 74–84. In Russ.].

MAST CELLS IN THE SYSTEM OF UTERUS REGULATION IN RATS

© 2019 S. V. Dindyaev^{1*}, F. A. Romashin¹, D. V. Kasatkin²

*E-mail: dindyaev@mail.ru

¹Department of histology, embryology, cytology of FSBEI HE IvSMA MOH Russia, Ivanovo, Russia;

²Regional Budgetary Institution of Healthcare “Municipal Hospital № 7”, Ivanovo, Russia

Received: 12.03.2019. Accepted: 25.03.2019

The dynamics of the density of the spatial distribution of mast cells of the body of the womb and the content of catecholamines, serotonin and histamine during sexual cycle, pregnancy and postpartum period in rats were examined by fluorescence-histochemical methods. The linear correlation of serotonin&catecholamines content in mast cells was kept at high level (during sexual cycle, pregnancy) or was quickly recovered (during postpartum involution) by changing of the uterus functional state. The participation of mast cells in the restoration of uterine sympathetic innervation after birth was considered. The leading role of mast cells in paracrine regulation of uterine tissue morphogenesis was assumed.

Key words: mast cells, uterus, sexual cycle, pregnancy, postpartum period, biogenic amines

Authors:

Dindyaev S. V., ✉ PhD, Head of department of histology, embryology, cytology FSBEI HE IvSMA MOH Russia), Ivanovo, Russia.
E-mail: dindyaev@mail.ru;

Romashin F. A., Lecturer of department of histology, embryology, cytology FSBEI HE IvSMA MOH Russia), Ivanovo, Russia;

Kasatkin D. V., Doctor of urological center, Regional Budgetary Institution of Healthcare “Municipal hospital No. 7”, Ivanovo, Russia.

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ТРЁХЛОКУСНЫХ ГАПЛОТИПОВ TLR10–TLR1–TLR6 В ПОПУЛЯЦИИ ТАТАР ЧЕЛЯБИНСКОЙ ОБЛАСТИ В СРАВНЕНИИ С ПОПУЛЯЦИЯМИ ЕВРАЗИИ

© 2019 г. А. В. Евдокимов

Email: avdax@yandex.ru

ФГБОУ ВО «Челябинский государственный университет», Челябинск, Россия

Поступила: 14.03.2019. Принята: 29.03.2019

В данной статье рассмотрены особенности распределения гаплотипов кластера TLR10–TLR1–TLR6 в популяции татар Челябинской области. Впервые для популяции татар получены частоты встречаемости трёхлокусных гаплотипов по точковым полиморфизмам 721A>C гена TLR10, 1805T>G гена TLR1 и 745C>T гена TLR6. Среди мировых евразийских популяций наиболее сходные значения частот гаплотипов выявлены у тосканцев и иберийцев, в то время как от других популяций Евразии татары достоверно отличались. Полученные данные могут быть полезны при изучении предикторов аутовоспалительных и инфекционных заболеваний.

Ключевые слова: толл-подобные рецепторы, кластер TLR10–TLR1–TLR6, однонуклеотидные полиморфизмы, татары, Челябинская область

DOI: 10.31857/S102872210006706-1

Адрес: 454001, г. Челябинск, ул. Братьев Кашириных, 129, ФГБОУ ВО «Челябинский государственный университет», биологический факультет, кафедра микробиологии, иммунологии и общей биологии. Евдокимов Александр Викторович. Тел./факс: +7 (351) 799-71-76, 8 950 732 45 25 (моб.)
E-mail: avdax@yandex.ru

Авторы:

Евдокимов А. В., канд. биол. наук., доцент кафедры микробиологии, иммунологии и общей биологии биологического факультета Челябинского государственного университета, Челябинск, Россия.

ВВЕДЕНИЕ

Развитие взаимоотношений между микроорганизмами (собственной микробиотой и патогенами) и макроорганизмом-хозяином характеризуется становлением универсальных механизмов взаимодействия, базирующихся на врождённом иммунитете. Распознавание патогенов клетками врождённого иммунитета происходит с помощью многочисленных рецепторных структур, в числе которых наиболее изучены толл-подобные рецепторы (TLR). В ходе эволюции человека, под действием естественного отбора в генах TLR происходило изменение соотношения одиночных нуклеотидных замен, влиявших на функциональную активность рецепторов и создающих адаптивные преимущества в условиях различной микробной нагрузки [1]. Наибольшее количе-

ство подобных полиморфизмов, несущих следы естественного отбора, находится в области генного кластера TLR10–TLR1–TLR6 на коротком плече 4 хромосомы [2]. Функциональные исследования показали, что отдельные полиморфизмы в области данного кластера определяют снижение активации через соответствующие рецепторы, проявляющееся в виде ослабленного иммунного ответа. Считается, что такой сниженный ответ повышал выживаемость в ходе эпидемий чумы в Европе.

Челябинская область является одним из многонациональных регионов России. С глубокой древности на территории области сталкивались народы, пришедшие с Востока и с Запада. В результате их взаимодействия происходило генетическое смешение и формирование новых этносов. На сегодняшний день данные о полиморфизмах TLR разрознены и, в основном, ограничиваются несколькими мировыми популяциями. В связи с этим представляется актуальным исследование распределения полиморфизмов генов TLR, несущих следы влияния естественного отбора, что позволит лучше понимать различия в чувствительности к современным инфекционным и аутоиммунным заболеваниям в различных популяциях.

Цель работы. Оценить распределение трёх-локусных гаплотипов TLR10–TLR1–TLR6 по точковым полиморфизмам 721A>C (ген TLR10), 1805T>G (ген TLR1) и 745C>T (ген TLR6) в популяции татар Челябинской области и провести сравнение с аналогичными данными для некоторых евразийских популяций.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование включены представители популяции татар (n=110), проживающих постоянно на территории Челябинской области (ЧО). Выделение ДНК из образцов венозной крови проведено с помощью наборов реагентов «К-сорб-100» (Синтол, Москва). Генотипирование проводилось методом аллель-специфической ПЦР (745C>T; набор реагентов НПФ «Литех», Москва) и с помощью анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (1805T>G и 721A>C; рестриктазы AluI и NlaIII соответственно). Детекция продуктов ПЦР проводилась методом электрофореза в 3% агарозном геле. Для проведения сравнительного анализа из открытой базы данных 1000 genomes были использованы данные по распределению гаплотипов TLR10–TLR1–TLR6 в 5 европейских (британцы, северо-западные европейцы, финны, иберийцы, тосканцы) и 5 азиатских (бенгалцы, гуджаратцы, пенджабцы, китайцы хань, японцы) популяциях. Статистическая обработка данных проведена в программах Arlequin v. 3.5, Past v.3.20: 1) оценка частот трёх-локусных гаплотипов (hf) TLR10–TLR1–TLR6; 2) расчёт коэффициента неравновесного сцепления (D') для пар локусов; 3) кластерный анализ; 4) анализ главных компонент.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Наиболее часто встречающимися гаплотипами в популяции татар ЧО стали С–Т–С (hf=29,5%), А–Г–Т (hf=25,0%), А–Г–С (hf=19,5%) и С–Г–С (hf=12,7%). Частота остальных гаплотипов составляет менее 2,0%. Для большей части распространённых гаплотипов в популяции татар ЧО характерно наличие точковой замены в гене TLR1 1805T>G, которая считается основной «мишенью» для действия отбора в гаплотипе TLR10–TLR1–TLR6. Для гаплотипов А–Г–Т и С–Т–С были получены статистически значимые положительные значения коэффициента D' для всех пар составляющих локусов, что свидетельствует о неравновесном сцеплении локусов в данных гаплотипах.

Неравновесное сцепление является косвенным подтверждением события позитивного естественного отбора, имевшего место на территории Европы во время нескольких раундов эпидемий высококовирулентных инфекций.

Согласно кластерному анализу, изученные популяции разделились на три кластера: «Азиатский» (бенгалцы, гуджаратцы, пенджабцы, китайцы хань и японцы), «Северо-европейский» (финны, британцы, северо-западные европейцы) и «Южно-европейский» (татары, тосканцы, иберийцы). Для азиатских популяций характерно наличие гаплотипов А–Т–С и С–Т–С. Европейских популяций отличаются по частотам гаплотипов А–Г–С, С–Г–Т, А–Г–Т, С–Г–С, содержащих мутантный вариант аллеля 1805*G в гене TLR1, связанный с формированием сниженного провоспалительного ответа. Для «Южно-европейского» кластера характерно повышение частоты гаплотипов С–Т–Т и А–Т–Т. Такое расположение татар Челябинской области, выявленное на основании анализа частот распределения гаплотипов генов TLR, согласуется с результатами, полученными в ходе исследований генетического разнообразия татар по другим генетическим системам [4, 5].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Barreiro L. B., Quintana-Murci L. From evolutionary genetics to human immunology: how selection shapes host defense genes. // *Nature Review Genetics*.— 2010.— № 11.— P. 17–30.
2. Dannemann M., Andres A. M., Kelso J. Introgression of Neandertal- and Denisovan-like Haplotypes Contributes to Adaptive Variation in Human Toll-like Receptors // *The American Journal of Human Genetics*.— 2016.— № 98.— P. 22–33.
3. Casanova J.-L., Laurent A., Quintana-Murci L. Human TLRs and IL-1Rs in Host Defense: Natural Insights from Evolutionary, Epidemiological, and Clinical Genetics // *Annu. Rev. Immunol.*— 2011.— № 29.— P. 447–491.
4. Балановская Е. В., Балановский О. П. Русский генофонд на Русской равнине.— Москва: Луч, 2007.— 416 с. [*Balanovskaya E. V., Balanovsky O. P. Russian gene pool on The Russian plain.*— Moscow: Luch, 2007.— 416 p.].
5. Чернова М. С. Иммуногенетический профиль популяций Челябинской области (русские, татары, башкиры, нагайбаки) в структуре мировых популяций: автореф. дис. ... канд. биол. наук (14.03.09) / Чернова Мария Сергеевна.— Челябинск, 2014.— 22 с. [*Chernova M. S. Immunogenetic profile of the Chelyabinsk Region populations (Russians, Tatars, Bashkirs, Nagaibaks) in the world populational structure: abstract of dissertation ... cand. biol. sciences / M. S. Chernova; Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, 2014. 22 p.*].

**THREE-LOCUS TLR10–TLR1–TLR6 HAPLOTYPES DISTRIBUTION
IN TATARS OF THE CHELYABINSK REGION IN COMPARISON
WITH THE POPULATIONS OF EURASIA**

© 2019 A. V. Evdokimov

Email: avdax@yandex.ru

*Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education
“Chelyabinsk State University”, Chelyabinsk, Russia*

Received: 14.03.2019 **Accepted:** 29.03.2019

This article describes the cluster TLR10-TLR1-TLR6 haplotypes distribution features observed in Tatars of the Chelyabinsk Region. For the first time in Tatars population the frequencies of three-locus haplotypes – 721A>C in TLR10 gene, 1805T>G in TLR1 gene and 745C>T in TLR6 gene – were obtained. The most similar haplotype frequencies among the world Eurasian populations were identified in Tuscans and Iberians, while other Eurasian populations differed significantly from Tatars. The data obtained may be useful in the study of predictors of auto-inflammatory and infectious diseases.

Key words: toll-like receptors, TLR10–TLR1–TLR6 cluster, single nucleotide polymorphisms, Tatars, Chelyabinsk Region

Authors:

Evdokimov A. V., candidate of biological sciences, assistant professor at the Department of microbiology, immunology and general biology of the biology faculty at the Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russia.

ВЛИЯНИЕ ПРЕПАРАТОВ ГРУППЫ 1,3,4-ТИАДИАЗИНЫ НА ФРАКЦИИ ЛЕЙКОЦИТОВ КРЫС С САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 2 ТИПА

© 2019 г. В. В. Емельянов¹, С. А. Бриллиант², И. Ф. Гетте^{1,2*},
И. Г. Данилова^{1,2}, Л. П. Сидорова¹, Т. А. Цейтлер¹

*E-mail: i.goette@yandex.ru

¹ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет им. первого президента России
Б. Н. Ельцина», Екатеринбург, Россия;

²ФБГУН Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, Екатеринбург, Россия

Поступила: 28.02.2019. Принята: 13.03.2019

Введение двух соединений класса замещенных 1,3,4-тиадиазин (L-17 и L-14) сопровождалось нормализацией общего количества и фракций лейкоцитов периферической крови у крыс с сахарным диабетом 2 типа, полученным введением никотинамида и стрептозотоцина. L-17 способствовал снижению гипергликемии более эффективно, чем L-14.

Ключевые слова: лейкоциты, сахарный диабет 2 типа, тиадиазины

DOI: 10.31857/S102872210006705-0

Адрес: 620049, Свердловская область, г. Екатеринбург, ул. Первомайская, 106, ФБГУН «Институт иммунологии и физиологии» УрО РАН, лаборатория морфологии и биохимии, Гетте Ирина Федоровна. Тел: +7(343) 374-08-39 доб.130.

E-mail: i.goette@iip.uran.ru

Авторы:

Емельянов В. В., к.м.н., доцент кафедры медицинской биохимии и биофизики ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет им. первого президента России Б. Н. Ельцина», Екатеринбург, Россия;

Бриллиант С. А., м.н.с. лаборатории иммунофизиологии и иммунофармакологии ИИФ УрО РАН, научный сотрудник ЦЭЛЬ ГАУЗ СО ИМКТ, Екатеринбург, Россия;

Гетте И. Ф., к.б.н., ст.н.с. лаборатории морфологии и биохимии ИИФ УрО РАН, ст.н.с. кафедры иммунохимии ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет им. первого президента России Б. Н. Ельцина», Екатеринбург, Россия;

Данилова И. Г., д.м.н., доцент, зав. лабораторией морфологии и биохимии ИИФ УрО РАН, зав. кафедрой медицинской биохимии и биофизики ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет им. первого президента России Б. Н. Ельцина», Екатеринбург, Россия;

Сидорова Л. П., к.х.н., ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет им. первого президента России Б. Н. Ельцина», Екатеринбург, Россия;

Цейтлер Т. А., доцент кафедры органической и биомолекулярной химии ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет им. первого президента России Б. Н. Ельцина», Екатеринбург, Россия.

Сахарный диабет второго типа (СД2) является широко распространенным и социально

значимым заболеванием. Изменение соотношения фракций лейкоцитов при СД2 связывают с хроническим воспалительным процессом [1] и осложнением в виде микроангиопатии [2]. Высокая частота встречаемости СД2 и его осложнений определяет поиск новых лекарственных средств, оказывающих действие на несколько звеньев патогенеза заболевания. Синтетические соединения группы 1,3,4-тиадиазин обладают сочетанным гипогликемическим и антиоксидантным действием [3,4]. Ранее было выявлено корректирующее действие представителя 1,3,4-тиадиазин L-17 на показатели периферической крови крыс с аллоксановым диабетом, являющимся моделью сахарного диабета 1 типа [4].

Цель исследования — выявить влияние двух производных тиадиазин, содержащих в качестве заместителей в положении — 2 тиадиазинового кольца остаток морфолина (L-17) и аминопропилморфолина (L-14), на содержание лейкоцитов периферической крови крыс при моделировании сахарного диабета 2 типа.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперимент проведен на крысах-самцах линии Wistar массой 230–340 г в соответствии с рекомендациями международных этических комитетов и Директивой Совета ЕС 2010/63/EU.

СД2 моделировали внутривенным введением раствора никотинамида (110 мг/кг) и стрептозотоцина в цитратном буфере (65 мг/кг) с интервалом 15 минут [5]. Животные были разделены на группы по 5 крыс: интактная, СД2, СД2+L-17, СД2+L-14. Растворы L-17 и L-14 из расчета 40 мг/кг вводили внутримышечно, 12 инъекций в течение месяца. Животных выводили из эксперимента передозировкой эфира. В крови определяли содержание глюкозы, мочевины и креатинина стандартными наборами «Витал Диагностикс» (СПб) и гликированного гемоглобина (HbA1c) методом аффинной гель-хроматографии набором «Диабет-тест» фирмы ФОСФОСОРБ (Москва). Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре DU-800 (Beckman, USA). Анализ периферической крови проводили на гематологическом анализаторе Celly 70 BiocodeHusel. Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета Statistica 6,0 фирмы StatSoft. Для оценки статистической значимости различий в выборках использовали критерий (U) Манна-Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ

У крыс группы СД2 в крови достоверно увеличилось содержание глюкозы с $5,1 \pm 0,2$ ммоль/л до $14,3 \pm 0,7$ ммоль/л, HbA1c с $4,3 \pm 0,3\%$ до $6,6 \pm 0,5\%$ и мочевины с $5,1 \pm 0,3$ ммоль/л до $14,9 \pm 3,1$ ммоль/л, содержание креатинина снизилось с $64,1 \pm 2,5$ мкмоль/л до $47,9 \pm 2,6$ мкмоль/л ($P < 0,05$). После инъекций L-17 и L-14 диабетическим крысам содержание глюкозы уменьшилось по сравнению с показателями нелеченных крыс соответственно до $8,8 \pm 0,7$ ммоль/л и $12,0 \pm 1,3$ ммоль/л. Снизилось также содержание HbA1c при действии L-17 до $5,7 \pm 0,4\%$ и при действии L-14 до $6,2 \pm 0,2\%$ по сравнению с показателем группы СД2. В группе животных, получавших инъекции L-17, снижение уровня глюкозы и HbA1c сопровождалось нормализацией содержания мочевины. Поскольку у диабетических крыс не происходило накопления креатинина в крови, увеличение количества мочевины можно расценивать как следствие усиления глюконеогенеза, а нормализацию после действия L-17 как снижение интенсивности глюконеогенеза. У животных, не получавших инъекции тиадиазинов, общее количество лейкоцитов было увеличено до $16,79 \pm 0,67$ тыс./мкл по сравнению с показателем интактных крыс $10,76 \pm 0,79$ тыс./мкл ($P < 0,05$), при этом почти в два раза увеличилось количество лимфоци-

тов и средних клеток без изменения фракции гранулоцитов. В обеих группах крыс, леченных L-17 и L-14, происходила нормализация общего количества лейкоцитов и их фракций, различия достоверны при сравнении с тестами СД2 ($P < 0,05$). Возрастание содержания лейкоцитов и лимфоцитов служит причиной аутоиммунной агрессии в отношении β -клеток островков поджелудочной железы и развития гипергликемии. Нормализация общего количества лейкоцитов, лимфоцитов и средних клеток в периферической крови диабетических крыс при действии L-17 и L-14 может быть показателем снижения воспалительного процесса как на уровне целого организма, так и в поджелудочной железе. Оба исследованных соединения оказывали сходное влияние на содержание лейкоцитов и их фракций, но антигликемическое действие L-17 было более выраженным, чем действие L-14.

Исследование поддержано грантом РФФИ № 16.15.00039 и проведено в рамках бюджетной темы № АААА-А18-118020590107-0.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Akbari M., Hassan-Zadeh V. Hyperglycemia Affects the Expression of Inflammatory Genes in Peripheral Blood Mononuclear Cells of Patients with Type 2 Diabetes. *Immunol Invest.* 2018; 47(7), 654–665.
2. Mineoka Y., Ishii M., Hashimoto Y., Nakamura N., Katsumi Y., Isono M., Fukui M. Neutrophil-lymphocyte ratio correlates with limited joint mobility of hand in patients with type 2 diabetes. *Endocr J.* 2018; 65(10), 1011–1017.
3. Емельянов В. В., Саватеева Е. А., Сидорова Л. П., Цейтлер Т. А., Гетте И. Ф., Булавинцева Т. С., Смирных С. Е., Максимова Н. Е. 2-Морфолино-5-фенил-6Н-1,3,4-тиадиазин корригирует метаболические нарушения при формировании аллоксанового сахарного диабета у крыс // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2016. Т. 162, № 7. С. 42–45. [Emelyanov V. V., Savateeva E. A., Sidorova L. P., Zeitler T. A., Gette I. F., Bulavintseva T. S., Smirnykh S. E., Maksimova N. E. 2-Morpholino-5-phenyl-6H-1,3,4-thiadiazine corrects metabolic disorders in the formation of alloxan diabetes in rats // Bulletin of experimental biology and medicine. 2016. V. 162, № 7. P. 42–45.]
4. Емельянов В. В., Бриллиант С. А., Гетте И. Ф., Данилова И. Г., Ключева Ю. Н., Сидорова Л. П., Цейтлер Т. А. Влияние соединения 2-морфолино-5-фенил-6Н-1,3,4-тиадиазин гидробромида на изменение гематологических показателей крыс с аллоксановым диабетом // Российский иммунологический журнал. 2018. Т. 12(21), № 3. С. 276–280. [Emelyanov V. V., Brilliant S. A., Gette I. F., Danilova I. G., Klyueva Yu. N., Sidorova L. P., Zeitler T. A. Effect of compound 2-morpholino-5-phenyl-6n-1,3,4-thia-

- diazine hydrobromide on the change in hematological indices of rats with alloxan diabetes // Russian Immunological Journal. 2018. V. 12 (21), № 3. P. 276–280.]
5. Спасов А. А., Воронкова М. П., Сингур Г. Л., Чепляева Н. И., Чепурнова М. В. Экспериментальная мо-

дель сахарного диабета типа 2 // Биомедицина. 2011, № 3. С. 12–18. [Spasov A. A., Voronkova M. P., Singur G. L., Cheplyaeva N. I., Chepurnova M. V. Experimental model of type 2 diabetes mellitus // Biomedicine. 2011, № 3. P. 12–18.]

INFLUENCE OF 1, 3, 4-TIADIAZINE GROUP COMPOUNDS ON LEUKOCYTE FRACTIONS OF TYPE2 DIABETIC RATS

© 2019 V. V. Emelyanov¹, S. A. Brilliant², I. F. Gette^{1,2*},
I. G. Danilova^{1,2}, L. P. Sidorova¹, T. A. Tseitler¹

*E-mail: i.goette@yandex.ru

¹Ural Federal University named after the first president of Russia B. N. Yeltsin, Yekaterinburg, Russia;

²Institute of Immunology and Physiology UB RAS, Yekaterinburg, Russia

Received: 28.02.2019. Accepted: 13.03.2019

The injections of two compounds of the substituted 1, 3, 4-thiadiazines class (L-17 and L-14) were accompanied by normalization of the total number and fractions of peripheral blood leukocytes in rats with type 2 diabetes, obtained by administration of nicotinamide and streptozotocin. L-17 is more effective than L-14 in reducing hyperglycemia.

Key words: leukocytes, type 2 diabetes mellitus, thiadiazines

Authors:

Emelyanov V. V., PhD, Associate Professor, Department of Medical Biochemistry and Biophysics, Ural Federal University named after the first president of Russia B. N. Yeltsin, Yekaterinburg, Russia;

Brilliant S. A., junior researcher, laboratory of immunophysiology and immunopharmacology IIF UB RAS, researcher GUZ SO IMKT, Yekaterinburg, Russia;

Gette I. F., Ph.D., senior researcher, laboratory of morphology and biochemistry IIF UB RAS, senior researcher Department of Immunochemistry Ural Federal University named after the first president of Russia B. N. Yeltsin, Yekaterinburg, Russia.

E-mail: i.goette@iip.uran.ru;

Danilova I. G., MD, Associate Professor, Head of the Laboratory of Morphology and Biochemistry IIF UB RAS, Head of the Department of medical biochemistry and biophysics Ural Federal University named after the first president of Russia B. N. Yeltsin, Yekaterinburg, Russia;

Sidorova L. P., Ph.D., Ural Federal University named after the first president of Russia B. N. Yeltsin, Yekaterinburg, Russia;

Tseitler T. A., associate professor of the Department of Organic and Biomolecular Chemistry, Ural Federal University named after the first president of Russia B. N. Yeltsin, Yekaterinburg, Russia.

ДИСБАЛАНС СОДЕРЖАНИЯ ЦИТОКИНОВ И ФАКТОРОВ РОСТА ВО ВНУТРИГЛАЗНОЙ ЖИДКОСТИ ПРИ ПЕРВИЧНОЙ ОТКРЫТОУГОЛЬНОЙ ГЛАУКОМЕ

© 2019 г. О. В. Ермакова^{1*}, Н. Б. Орлов², А. Н. Трунов^{1,3},
В. И. Коненков², В. В. Черных¹

*E-mail: oven_e@mail.ru

¹ФГАУ Национальный медицинский исследовательский центр «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С. Н. Федорова» Министерства здравоохранения Российской Федерации», Новосибирский филиал, Новосибирск, Россия;

²«НИИ клинической и экспериментальной лимфологии – филиал ФГБУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН», Новосибирск, Россия;

³ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» СО РАН, Новосибирск, Россия

Поступила: 05.02.2019. Принята: 18.02.2019

Установлено повышение концентраций цитокинов и факторов роста (ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-17, трансформирующих факторов роста бета-1, 2, 3, макрофагального воспалительного протеина – 1 бета), во внутриглазной жидкости пациентов с развитой стадией первичной открытоугольной глаукомы, что свидетельствует об активности в патогенезе заболевания местного хронического воспалительного процесса.

Ключевые слова: первичная открытоугольная глаукома, внутриглазная жидкость, цитокины, факторы роста

DOI: 10.31857/S102872210006704-9

Адрес: 630096, г. Новосибирск, ул. Колхидская д. 10. ФГАУ Национальный медицинский исследовательский центр «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С. Н. Федорова» Министерства здравоохранения Российской Федерации», Новосибирский филиал. Ермакова Ольга Викторовна.
Телефон: +7(383) 341-01-55; Факс: +7(383) 340-37-37
моб. +79139100316

E-mail: oven_e@mail.ru

Авторы:

Ермакова О. В., врач-офтальмолог Новосибирского филиала ФГАУ Национальный медицинский исследовательский центр «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С. Н. Федорова» МЗ РФ», Новосибирск, Россия;

Орлов Н. Б., к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории иммуногенетики «НИИ клинической и экспериментальной лимфологии» – филиал ФГБУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН», Новосибирск, Россия;

Трунов А. Н., д.м.н., профессор, заместитель директора по научной работе Новосибирского филиала ФГАУ Национальный медицинский исследовательский центр «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С. Н. Федорова» МЗ РФ», главный научный сотрудник лаборатории иммунологии ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» СО РАН, Новосибирск, Россия;

Коненков В. И., д.м.н., профессор, академик РАН, заведующий лабораторией клинической иммуногенетики «НИИ клинической и экспериментальной лимфологии» – филиал ФГБУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН», Новосибирск, Россия;

Черных В. В., д.м.н., профессор, директор Новосибирского филиала ФГАУ Национальный медицинский исследовательский центр «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С. Н. Федорова» МЗ РФ», Новосибирск, Россия.

АКТУАЛЬНОСТЬ

В научной литературе представлены результаты немногочисленных научных исследований, посвященных изучению содержания различных классов цитокинов при первичной открытоугольной глаукоме (ПОУГ) и делаются предположения о значимости их дисбаланса в развитии процессов нейродегенерации, повреждения трабекулы и др., однако, окончательных выводов не сделано, а научная дискуссия о их роли в патогенезе глаукомы продолжается [1, 2, 3, 4], что определяет актуальность дальнейших углу-

бленных исследований и позволяет сформулировать цель исследования.

Цель. Изучить содержание цитокинов и факторов роста во внутриглазной жидкости (ВГЖ) у пациентов с развитой стадией ПОУГ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Обследовано 50 пациентов с верифицированным диагнозом развитой стадии ПОУГ, контрольную группу составили 30 пациентов с диагнозом неосложненная катаракта. У всех пациентов на начальных этапах проведения оперативного лечения были забраны образцы внутриглазной жидкости (75–100 мкл), которые были заморожены и хранились при -70°C до проведения исследования. Концентрацию 17 цитокинов и 3 изоформ TGF- β определяли с использованием набора фирмы BioRad (США) методом проточной флюориметрии на двухлучевом лазерном анализаторе — Bio-Plex 200. Полученные данные были подвергнуты статистическому анализу. Значимость различий вариационных рядов в несвязанных выборках оценивали с помощью критерия Манна-Уитни.

У всех пациентов было получено информированное согласие на проведение операции, забор внутриглазной жидкости, а также использование данных исследования в научных целях.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В результате проведенного исследования было показано, что у пациентов с ПОУГ в ВГЖ определялось более чем 5-кратное повышение концентрации ИЛ-6, провоспалительного полипотентного цитокина, участвующего в процессах хронизации воспаления, аутоиммунного реагирования и способного регулировать синтез ряда провоспалительных цитокинов (22.52 ± 6.94 пг/мл и 4.32 ± 0.55 пг/мл соответственно; $p=0.021$), более чем 3-кратное повышение концентрации ИЛ-8, являющегося хемоаттрактантом, высокие концентрации которого приводят к активации миграции клеток иммунной системы в очаги повреждения при развитии воспалительного процесса (4.66 ± 0.64 пг/мл и 1.41 ± 0.36 пг/мл соответственно; $p=0.002$), достоверное, в 1,6 раза, повышение концентрации ИЛ-17А способного активировать синтез цитокинов, обладающих провоспалительными свойствами, молекул клеточной и межклеточной адгезии и др. (9.18 ± 0.48 пг/мл и 5.70 ± 1.74 пг/мл соответственно; $p=0.001$) и более чем полтора кратное

повышение макрофагального воспалительного протеина — I бета, участвующего совместно с ИЛ-8 в инициации и развитии деструктивно воспалительного процесса (26.61 ± 4.72 пг/мл и 14.28 ± 1.42 пг/мл соответственно; $p=0.014$). Также было установлено нарастание во ВГЖ пациентов с развитой стадией ПОУГ концентраций TGF- $\beta 1$ (в 3,1 раза, 304.40 ± 36.70 и 97.15 ± 10.90 , соответственно; $p=0.001$), TGF- $\beta 2$ (в 1.4 раза, 3201.60 ± 181.10 и 2317.02 ± 112.80 , соответственно; $p=0.028$), и TGF- $\beta 3$ (в 6.9 раз, 26.83 ± 4.27 пг/мл и 4.40 ± 1.7 пг/мл, соответственно; $p=0.001$).

Полученные данные позволяют сделать заключение о значимости локального воспаления в патогенезе ПОУГ, которое сопровождается активацией сигнальных путей, направленных на повышение синтеза трансформирующих факторов роста. Данные процессы можно рассматривать как направленные на компенсацию последствий развития местного деструктивно-воспалительного процесса, однако, они могут приводить к избыточной активации синтеза белков внеклеточного матрикса и его ремоделированию в трабекулярной сети, с увеличением сопротивления оттоку внутриглазной жидкости и повышением внутриглазного давления, что играет значимую роль в патогенезе ПОУГ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Черных В. В., Бгатова Н. П., Орлов Н. Б., Ермакова О. В., Трунов А. Н. Местный воспалительный процесс при глаукоме как возможное проявление нарушений увеолимфатического оттока внутриглазной жидкости при глаукоме. Национальный журнал глаукома. 2018. 17(2). 3–11. [Chernykh V. V., Bgatova N. P., Orlov N. B., Ermakova O. V., Trunov A. N. Local inflammatory process as a possible manifestation of intraocular fluid uveolymphatic outflow defects in glaucoma. National Journal of Glaucoma. 2018. 17(2). 3–11].
2. Junglas B., Kuespert S., Seleem A. A., Struller T., Ullmann S., Bösl M., Bosserhoff A., Köstler J., Wagner R., Tamm E. R., Fuchshofer R. Connective tissue growth factor causes glaucoma by modifying the actin cytoskeleton of the trabecular meshwork. Am. J. Pathol. 2012. 180(6). 2386–2403.
3. Kokubun T., Tsuda S., Kunikata H., Yasuda M., Himori N., Kanimatsu-Sanuki S., Maruyama K., Nakazawa T. Characteristic profiles of inflammatory cytokines in the aqueous humor of glaucomatous eyes. Ocul. Immunol. Inflamm.—2017. 16. 1–12.
4. Tong Y., Zhou Y. L., Zheng Y., Biswal M., Zhao P. Q., Wang Z. Y. Analyzing cytokines as biomarkers to evaluate severity of glaucoma. Int. J. Ophthalmol.—2017. 10(6). 925–930.

IMBALANCE IN THE CONTENT OF CYTOKINES AND GROWTH FACTORS IN THE INTRAOCULAR FLUID IN PRIMARY OPEN-ANGLE GLAUCOMA

© 2019 O. V. Ermakova^{1*}, N. B. Orlov², A. N. Trunov^{1,3},
V. I. Konenkov², V. V. Chernykh¹

*E-mail: oven_e@mail.ru

¹The academician S. N. Fyodorov Federal State Institution National Medical Research Center «Intersectoral Research and Technology Complex «Eye microsurgery» Ministry of Health of the Russian Federation», Novosibirsk Branch, Novosibirsk, Russia;

²Scientific Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology – a branch of Federal Research Center of the Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences», Novosibirsk, Russia;

³Federal Research Center for Fundamental and Translational Medicine of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences», Novosibirsk, Russia

Received: 05.02.2019. Accepted: 18.02.2019

Was shown increase in the concentrations of cytokines and growth factors (IL-4, IL-6, IL-8, IL-17, TGF- β -1, 2, 3, macrophage inflammatory protein – 1beta) in the intraocular fluid of patients with developed stage of the primary open-angle glaucoma. This indicates that in the pathogenesis of primary open-angle glaucoma, the activity of the local chronic inflammatory process is determined.

Key words: Primary open-angle glaucoma, intraocular fluid, cytokines, growth factors

Authors:

Ermakova O. V., ✉ Ophthalmologist, Novosibirsk Branch of the academician S. N. Fyodorov Federal State Institution National Medical Research Center «Intersectoral Research and Technology Complex “Eye microsurgery» Ministry of Health of the Russian Federation, Novosibirsk, Russia. **E-mail:** oven_e@mail.ru;

Orlov N. B., PhD, Senior Researcher, Laboratory of Clinical Immunogenetics, Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology – Branch of the Institute of Cytology and Genetics, SBRAS, Novosibirsk, Russia;

Konenkov V. I., Dr. Med. Sci., Professor, Academician of Russian Academy of Science, Head of the Laboratory of Clinical Immunogenetics, Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology – Branch of the Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia;

Chernykh V. V., Dr. Med. Sci., Professor, Director, Novosibirsk Branch of the academician S. N. Fyodorov Federal State Institution National Medical Research Center «Intersectoral Research and Technology Complex «Eye microsurgery» Ministry of Health of the Russian Federation, Novosibirsk, Russia;

Trunov A. N., Dr. Med. Sci., Professor, Deputy Director for Science, Novosibirsk Branch of the academician S. N. Fyodorov Federal State Institution National Medical Research Center «Intersectoral Research and Technology Complex «Eye microsurgery» Ministry of Health of the Russian Federation, Novosibirsk, Russia; Chief Researcher of the Laboratory of Immunology Federal Research Center for Fundamental and Translational Medicine of the SB RAS, Novosibirsk, Russia.

ВАРИАНТЫ ГИБЕЛИ КЛЕТОК МЕСТНОГО ИММУНИТЕТА ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНИ ЛЕГКИХ

© 2019 г. С. В. Зиновьев*, Н. Г. Плехова, Н. М. Кондрашова

*E-mail: Sinowev@mail.ru

ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Минздрава РФ,
Владивосток, Россия

Поступила: 28.02.2019. Принята: 14.03.2019

Проведено морфологическое и цитохимическое исследование окислительного метаболизма клеток бронхоальвеолярного лаважа (БАЛ) пациентов с различной степенью тяжести хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ). Установлено, что наряду с некрозом клеток определяется энуклеация гранулоцитов и макрофагов, что относится к морфологическому признаку программируемой гибели путем образования внеклеточных ловушек – НЕТозов. Доказана корреляция между показателями НЕТозов, изменением окислительного метаболизма клеток и тяжестью течения ХОБЛ.

Ключевые слова: гибель клеток, бронхоальвеолярный лаваж, хроническая обструктивная болезнь легких

DOI: 10.31857/S102872210006703-8

Адрес: 690002 Владивосток, ул. Острякова д. 4, ФГБОУ ВО Тихоокеанский государственный медицинский университет Минздрава РФ, Зиновьев С. В.

Тел.: +7(914) 6726953 (моб.).

E-mail: Sinowev@mail.ru

Авторы:

Зиновьев С. В., к.м.н., старший научный сотрудник Центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО ТГМУ «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, Владивосток, Россия;

Плехова Н. Г., д.б.н., заведующая Центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО ТГМУ «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, Владивосток, Россия;

Кондрашова Н. М., к.м.н., доцент института терапии и инструментальной диагностики ФГБОУ ВО ТГМУ «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, Владивосток, Россия.

На настоящий момент эксперты международного номенклатурного комитета (Nomenclature Committee on Cell Death, NCCD) предлагают следующие подтипы гибели клеток: случайная гибель клеток или некроз (accidental cell death, ACD), при которой определяется необратимое разрушение структурной целостности; генетически кодируемый вариант – ре-

гулируемая клеточная смерть (regulated cell death, RCD) и вариант регулируемой клеточной смерти в рамках эмбриогенеза или сохранения физиологического гомеостаза ткани взрослых организмов – программируемая смерть клеток (ПСК). К последнему подтипу, согласно последней классификации, относят 12 видов (4 основных и 8 дополнительных) из которых наиболее распространенные апоптоз, аутофагия, кератинизация и нетипичные варианты: аноиксис, параптоз, пироптоз, пиронекроз, фагоптоз, НЕТоз (нейтрофильные внеклеточные ловушки, Neutrophil Extracellular Traps, NETs) и другие [1]. Морфологическая структура ловушки – НЕТоза представлена сетью, сформированной из ДНК, гистонов и антимикробных белков нейтрофилов. Показано, наличие таких структур в дыхательных путях у пациентов с хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ), но их клиническая и патофизиологическая роль не установлена [2].

Цель настоящего исследования – провести морфофункциональную оценку вариантов гибели клеток врожденного иммунитета у пациентов с ХОБЛ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Обследовано 80 пациентов в фазу обострения ХОБЛ. Степень тяжести заболевания оценивали согласно принятым стандартам и распределяли по следующим категориям: легкая (GOLD1); средняя (GOLD2); тяжелая (GOLD3); крайне тяжелая (GOLD4) [3]. В содержимом бронхоальвеолярного лаважа (БАЛ) проводили оценку общего цитоза в 1 мкл жидкости и морфологическую цитометрию, с определением вариантов гибели клеток в мазках, окрашенных по Романовскому-Гимза. Данные выражали в виде индекса деструкции клеток и индекса цитолиза клеток. В клетках определяли содержание фосфолипидов (окрашивание щелочным суданом черным Б), активность миелопероксидазы (метод Грэхема-Кнолля) и спонтанный НСТ-тест проводили согласно методу Виксмана М. Е. с соавт.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование клеточного состава БАЛ пациентов с ХОБЛ показало слизисто-гнойный вариант воспаления. В мазках помимо лейкоцитов отмечались кластеры клеток бронхиального эпителия – тельца Креола, и парциальный вес эозинофилов относительно всех клеток не превышал 5%. При сравнении групп пациентов с различной тяжестью ХОБЛ в БАЛ отмечалось значимое различие показателей цитоза (контроль $0,67 \pm 0,025 \times 10^3$ /мкл, тяжелое течение $0,996 \pm 0,072 \times 10^3$ /мкл; $p < 0,01$) и повышенное содержание нейтрофилов (контроль $41,2 \pm 1,428\%$, тяжелое течение $54,0 \pm 2,049\%$, $p < 0,01$). При цитоморфологическом исследовании БАЛ обнаружена тенденция к деструкции клеток врожденного иммунитета причем, повышенное содержание некротически измененных нейтрофилов наблюдалось у пациентов с тяжелым течением ХОБЛ. Наряду с некрозом, определялась энуклеация гранулоцитов и макрофагов, что относится к морфологическому признаку к варианту НЕТ-оза, для которого характерно разрушение цитоплазмы и перемещение значительной части хроматина за пределы плазмалеммы. Показатели деструкции клеток и НЕТ-оза (энуклеации) лейкоцитов коррелировали с цитохимическими показателями окислительно-метаболизма. При средней степени тяжести ХОБЛ отмечалась высокая функциональная активность макрофагов, СЦК НСТ-теста при средней степени тяжести составил $2,8 \pm 0,152$, что отличалось от показателей для здоровых лиц

$2,08 \pm 0,058$ ($p < 0,01$), напротив, при тяжелом течении ХОБЛ, обнаружено снижение бактерицидной активности нейтрофилов, о чем свидетельствовали низкие показатели НСТ-теста $1,6 \pm 0,071$ ($p < 0,05$). Подобные показатели были получены при изучении активности миелопероксидазы и содержания фосфолипидов в нейтрофилах и макрофагах. Причем, в БАЛ у 20% пациентов в цитоплазме альвеолярных макрофагов выявлялась слабая или умеренная реакция на содержание миелопероксидазы.

Таким образом, согласно полученным нами данным, гибель лейкоцитов в бронхиальном секрете помимо некроза, осуществляется по типу НЕТ-оза. Отмечается прямая связь между показателями НЕТ-оза в БАЛ и степенью тяжести ХОБЛ, оцененной с использованием комплексной глобальной инициативы по шкале ХОБЛ ($p < 0001$). Отмечалась корреляция между повышением показателей комплексов НЕТ-озов и симптомами, оцененными согласно тесту ХОБЛ, у пациентов с частыми обострениями ($p = 0,002$). При тяжелом течении ХОБЛ в БАЛ на фоне снижения функциональных резервов клеток отмечалось повышенное содержание НЕТ-озов лейкоцитов, что указывало на несостоятельность бактерицидной активности клеток. Результаты исследования подтверждают данные других авторов об участии фермента NADPH оксидазы в качестве кофактора НЕТ-оза [4]. Нельзя исключать, что эти данные отражают роль геминных белков в развитии гибели клеток, что подтверждает исследование цитохромов в развитии апоптоза и других форм гибели клеток. Повышение формирования НЕТ-озов в дыхательных путях может оказывать влияние на повреждение окружающих тканей, вызывая гибель эпителиальных и эндотелиальных клеток и приводя, таким образом, к нарушению функции легких и ускорению развития заболевания.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ/ REFERENCES

1. Galluzzi L., Maiuri M. C., Vitale I., Zischka H., Castedo M., Zitvogel L., Kroemer G. Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. *Cell Death Differ.* 2007, 14(7):1237–43.
2. Wright T. K., Gibson P. G., Simpson J. L., McDonald V. M., Wood L. G., Baines K. J. Neutrophil extracellular traps are associated with inflammation in chronic airway disease // *Respirology.* 2016 Apr;21(3):467–75.
3. Глобальная стратегия диагностики, лечения и профилактики хронической обструктивной болезни легких (пересмотр 2014 г.) / Пер с англ. Под ред. А. С. Белевского. М.: Российское респираторное общество, 2014:92.

4. Khan M. A., Philip L. M., Cheung G., Vadakepeedika S., Grasemann H., Sweezey N., Palaniyar N. Front Med (Lau-
sanne). Regulating NETosis: Increasing pH Promotes NADPH Oxidase-Dependent NETosis. 2018; 5:19.

THE VARIANTS OF DEATH INNATE IMMUNITY CELLS IN CHRONIC OBSTRUCTIVE LUNG DISEASE OBSTRUCTIVE LUNG

© 2019 S. V. Zinoviev*, N. G. Plekhova, N. M. Kondrashova

*E-mail: Sinowev@mail.ru

Pacific State Medical University, Vladivostok, Russia

Received: 28.02.2019. Accepted: 14.03.2019

A morphological and cytochemical study of the oxidative metabolism of cells bronchoalveolar lavage (BAL) patients with varying degrees of severity chronic obstructive pulmonary disease (COPD) was studied. It was established that along with cell necrosis, enucleation of granulocytes and macrophages is determined, which refers to the morphological feature of programmed death by the formation of extracellular traps – NET-osis. Proven correlation between indicators of netosis, changes in the oxidative metabolism of cells and the degrees of severity of COPD.

Key words: cell death, bronchoalveolar lavage, chronic obstructive pulmonary disease

Authors:

Zinoviev S. V., ☒ PhD, Senior Researcher, of the Central Research Laboratory, Pacific State Medical University, Vladivostok Russia.

E-mail: Sinowev@mail.ru;

Plekhova N. G., Dr, Head of the Central Research Laboratory, Pacific State Medical University, Vladivostok Russia;

Kondrashova N. M., PhD, assistant professor at the Institute of Therapy and Instrumental Diagnostics, Pacific State Medical University, Vladivostok, Russia.

РАЗРАБОТКА МОДЕЛЕЙ РОСТА ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ ЧЕЛОВЕКА ДЛЯ КЛЕТОЧНОЙ ИММУНОТЕРАПИИ

© 2019 г. Е. Ю. Златник*, А. Ю. Максимов, А. С. Гончарова,
Н. С. Карнаухова

*E-mail: elena-zlatnik@mail.ru, rnioid@list.ru

ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт»
Минздрава РФ, Ростов-на-Дону, Россия

Поступила: 13.03.2019 Принята: 27.03.2019

Проведено получение экспериментальных моделей эктопического и ортотопического роста злокачественных опухолей человека на бестимусных мышцах с последующим морфологическим и иммунологическим исследованием. Показана возможность получения опухолей, морфологически соответствующих исходным. Отмечены различные иммунологические изменения у животных с эктопически и ортотопически трансплантированной опухолью.

Ключевые слова: бестимусные мышцы, модели опухолей человека, лимфоциты

DOI: 10.31857/S102872210006702-7

Адрес: 344037 Ростов-на-Дону. 14-я линия, 63, ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России, лаборатория иммунофенотипирования опухолей, Златник Елена Юрьевна.
Тел.: 8 961 272 69 68 (моб.).

E-mail: elena-zlatnik@mail.ru

Авторы:

Златник Е. Ю., д.м.н., проф., гл.н.с. лаб. иммунофенотипирования опухолей ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт», Минздрава РФ, Ростов-на-Дону, Россия;

Максимов А. Ю., д.м.н., проф., зам. генерального директора по перспективным научным разработкам ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава РФ Ростов-на-Дону, Россия;

Гончарова А. С., к.б.н., зав. Испытательным лабораторным центром ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава РФ, Ростов-на-Дону, Россия;

Карнаухова Н. С., к.м.н., зав. патологоанатомическим отделением ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава РФ Ростов-на-Дону, Россия.

Разработка адекватных моделей опухолевого роста является актуальной задачей не только современной онкологии, но и экспериментальной иммунологии. Новое законодательство в области иммунотерапии опухолей с применением клеточных технологий на основе иммунокомпетентных клеток человека предполагает этап

доклинических испытаний *in vivo*, для чего необходимы соответствующие экспериментальные модели опухолевого роста, в частности, на иммунодефицитных мышцах [1]. Считается, что бестимусные мышцы не способны развивать иммунный ответ на введение ксеногенных (человеческих) опухолевых и иммунокомпетентных клеток [1, 2]. Эктопическая перевивка опухолей позволяет легко наблюдать за динамикой их роста, ортотопическая создает возможность формирования микроокружения опухоли и максимального приближения патологического процесса к наблюдаемому в клинике [2].

Цель работы: получение экспериментальных моделей эктопического и ортотопического роста злокачественных опухолей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводили на бестимусных мышцах линии Nu/J (n=20, самцы весом 21–25 г, возраст 7–8 недель), полученных из Российского национального центра генетических ресурсов лабораторных животных ИЦиГ СО РАН (г. Новосибирск), руководствуясь «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных». Животных содержали в SPF-отсеке вивария ФГБУ «РНИОИ» в си-

стеме IVС в комнатах с контролируемыми параметрами микроклимата (19–26 °С, влажность 40–60%, световой режим день–ночь). Животные имели свободный доступ к корму и воде, предварительно стерилизованным автоклавированием. Клетки рака легкого линии А-549, полученную из ИИЦ РАН (г. Санкт-Петербург), культивировали в виде монослоя в пластиковых флаконах в среде RPMI-1640 с 10% фетальной бычьей сыворотки при t 37 °С и 5% CO₂. Для создания эктопического (подкожного) ксенографта рака легкого человека клетки А-549 предварительно в течение 3-х дней наращивали на пористый скаффолд, представляющий собой сплав титана, алюминия и ванадия (8×4×2 мм), который имплантировали мышам подкожно. Для создания ортотопической пациентоподобной модели рака пищевода человека проводили операцию ксенотрансплантации фрагмента опухоли пищевода, взятого от больного, в пищевод мышцы линии Nu/J. Первичная опухоль характеризовалась как низкодифференцированная аденокарцинома. Ее промывали 3 раза средой 199 с добавлением 1% пенициллина/стрептомицина. Животных вводили в состояние наркоза при помощи комплексного анестетика «Золетил», для премедикации использовали препарат «Ксила». Для обеспечения доступа к пищеводу выполняли послойные разрезы кожи и ткани брюшной стенки мышцы, затем отодвинув левую долю печени вверх, надсекали стенку пищевода и фиксировали лигатурой фрагмент опухоли (2 мм³). Затем брюшную полость послойно ушивали. Животных с ортотопическим ксенографтом пищевода наблюдали в течение 1 месяца, с эктопическим ксенографтом рака легкого – в течение 55 дней, затем подвергали эвтаназии в CO₂ камере. Размеры ксенографтов рассчитывали по формуле Шрека для эллипсоида – $V = a \times b \times c \times \pi / 6$, где V – объем опухоли (мм³), a , b , c – максимальные диаметры эллипсоида в трех плоскостях (мм). Ткани опухолей фиксировали, готовили срезы, окрашивали гематоксилином и эозином. В крови мышей определяли количество популяций лимфоцитов (Т, В, NK) на проточном цитометре FACS CantoII (BD). Для статистической обработки применяли параметрические и непараметрические методы.

РЕЗУЛЬТАТЫ

При создании ортотопических моделей рака пищевода человека опухоль выявлена через 4 недели у 2 животных из 8. Размер ксенографтов со-

ставил 12,6 мм³ и 16,7 мм³. Выявленные опухоли были охарактеризованы морфологически как низкодифференцированные аденокарциномы с инвазией в ткани печени. Начало роста ксенографта, полученного при культивировании клеток рака легкого А549 на скаффолде, отмечено на 10-й день после имплантации; на 55-й день объем ксенографта составил 1207,6 мм³. Опухоль представляла собой низкодифференцированную немелкоклеточную карциному солидного строения с инвазией в жировую ткань. Лимфоциты в крови интактных бестимусных мышей составляют $67,7 \pm 3,1\%$, в основном представлены В-лимфоцитами – $89,3 \pm 1,2\%$, на долю Т-клеток приходится $1,6 \pm 0,4\%$. NK-клетки обнаружены у половины животных в количестве $0,1–0,4\%$ ($0,12 \pm 0,035\%$). Выявлена область неидентифицируемых данной панелью клеток в количестве $7,8 \pm 0,9\%$. Возможно, это моноциты, хотя при уменьшении размера данного гейта сокращался и процент лимфоцитов. Подобная субпопуляция описана среди спленоцитов иммунологически полноценных мышей [3]. Рост ортотопически трансплантированной опухоли сопровождается повышением содержания этих клеток (CD3e-CD19-) до 21% и NK-лимфоцитов до 12% при двукратном снижении общего уровня лимфоцитов за счет В-клеток. При росте эктопической опухоли отмечено снижение процента лимфоцитов без изменения состава их популяций.

ОБСУЖДЕНИЕ

Таким образом, получены модели ортотопических и эктопических опухолей, по морфологии соответствующих исходным, охарактеризована динамика их роста. Отмечены различные иммунологические изменения у животных-опухоленосителей с эктопически и ортотопически трансплантированными опухолями, причину которых предстоит исследовать. Разработанные модели роста злокачественных опухолей, в том числе, приближенные по характеру роста к новообразованиям больных, могут быть использованы для экспериментальной иммунотерапии опухолей с применением клеточных продуктов человеческого происхождения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. *Трещалина Е. М.* Иммунодефицитные мыши Balb/c Nude и моделирование различных вариантов опухолевого роста для доклинических исследований //

- Российский биотерапевтический журнал.— 2017.— Т. 16.— № . 3—С. 6—13. [*Treshalina H. M.* Immuno-deficient mice Balb/c Nude and modeling of various types of tumor growth for preclinical studies. Russian Journal of biotherapy. 2017; 16(3): 6–13 (In Russ).] doi: 10.17650/1726-9784-2017-16-3-6-13.
2. *Zhao X., Li L., Starr T. K., Subramanian S.* Tumor location impacts immune response in mouse models of colon cancer. *Oncotarget*, 2017; 8(33): 54775–54787. doi: 10.18632/oncotarget.18423.
3. *Karasova D., Sebkova A., Havlickova H., Sisak F., Volf J., Faldyna M., Ondrackova P., Kummer V., Rychlik I.* Influence of 5 major Salmonella pathogenicity islands on NK cell depletion in mice infected with Salmonella enterica serovar Enteritidis. *BMC Microbiol.*, 2010; 10: 75. Published online 2010 Mar 12 doi: 10.1186/1471-2180-10-75.

DEVELOPMENT OF MODELS OF HUMAN MALIGNANT TUMORS FOR CELLULAR IMMUNOTHERAPY

© 2019 E. Y. Zlatnik*, A. Yu. Maksimov, A. S. Goncharova, N. S. Karnaukhov

*E-mail: elena-zlatnik@mail.ru, rnioi@list.ru

Federal Budget Institution Rostov Research Institute of Oncology, Rostov-on-Don, Russia

Received: 13.03.2019. Accepted: 27.03.2019

Development of ectopic and orthotopic models of human malignant tumors in nude mice with consequent morphologic and immunologic studies was carried out. Morphologic compliancy of tumors having grown in mice to the initial ones was shown. Divergent immunologic changes were found in animals with ectopic and orthotopic tumors.

Key words: nude mice, models of human malignant tumors, lymphocytes

Authors:

Zlatnik E. Y., ✉ MD, Prof., Chief Researcher, Laboratory of Immunophenotyping of Tumors, Rostov Research Institute of Oncology, Rostov-on-Don, Russia. E-mail: elena-zlatnik@mail.ru, rnioi@list.ru;

Maksimov A. Yu., MD., Professor, Deputy General Director for Advanced Scientific Developments, Rostov Research Institute of Oncology, Rostov-on-Don, Russia;

Goncharova A. S., Ph D., Head of Experimental Laboratory Center, Rostov Research Institute of Oncology, Rostov-on-Don, Russia;

Karnaukhov N. S., Ph D., Head of Department of Pathological Anatomy, Rostov Research Institute of Oncology, Rostov-on-Don, Russia.

ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА СИНТЕТИЧЕСКИХ АНАЛОГОВ ГРАНУЛОЦИТАРНО-МАКРОФАГАЛЬНОГО КОЛОНИЕСТИМУЛИРУЮЩЕГО ФАКТОРА (ГМ-КСФ)

© 2019 г. А. В. Зурочка^{1,2*}, В. А. Зурочка^{1,2}, М. А. Добрынина¹, Л. О. Фомина¹, О. И. Забков¹, В. А. Гриценко³

*E-mail: av_zurochka@mail.ru

¹ФБГУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии образования, Екатеринбург, Россия;

²ФГАОУ ВО «Южно-Уральский государственный университет (национальный исследовательский университет)», Челябинск, Россия;

³ФБГУН «Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза» Уральского отделения Российской академии наук, Оренбург, Россия

Поступила: 11.03.2019. Принята: 22.03.2019

Было показано, что пептид активного центра ГМ-КСФ является плюрипотентным колониестимулирующим фактором, обладающим выраженным антибактериальным, противовирусным, иммуностимулирующим, репаративным, радиопротекторным действием *in vitro* и *in vivo*. Аналогичными свойствами обладает созданный на его основе косметический препарат АЦЕГРАМ.

Ключевые слова: синтетический пептид, антибактериальная, противовирусная, иммуностимулирующая, репаративная, колониестимулирующая активность

DOI: 10.31857/S102872210006701-6

Адрес: 620049, Екатеринбург, Первомайская улица, 106, ФБГУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, Зурочка Александр Владимирович. Тел.: +79043017639, E-mail: av_zurochka@mail.ru

Авторы:

Зурочка А. В., д.м.н., профессор, в.н.с. лаборатории иммунологии воспаления ФБГУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, Екатеринбург, Россия; профессор кафедры пищевых и биотехнологий, ФГАОУ ВО «Южно-Уральский государственный университет» (национальный исследовательский университет), Челябинск, Россия;

Зурочка В. А., д.м.н., с.н.с. лаборатории иммунологии воспаления ФБГУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, Екатеринбург, Россия; профессор кафедры пищевых и биотехнологий, ФГАОУ ВО «Южно-Уральский государственный университет» (национальный исследовательский университет), Челябинск, Россия;

Добрынина М. А., м.н.с. лаборатории иммунологии воспаления ФБГУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, Екатеринбург, Россия;

Фомина Л. О., аспирант ФБГУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии образования, Екатеринбург, Россия;

Забков О. И., аспирант ФБГУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии образования, Екатеринбург, Россия;

Гриценко В. А., д.м.н., профессор, заведующий лабораторией Института клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН, Оренбург, Россия.

АКТУАЛЬНОСТЬ

В последние годы пристальное внимание иммунологов привлекают свое внимание цитокины, в том числе и ростковые факторы, особое место среди которых занимает гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (ГМ-КС). Это связано с его выраженными плейотропными эффектами, которые являются как позитивными, так и, в ряде случаев, негативными [1]. В последние годы появились данные по синтетическому пептиду активного центра ГМ-КСФ, который обладает выраженной идентичной цельной молекуле активностью, у которого отсутствуют негативные его эффекты, и в то же время найдены свойства, не имеющиеся у колониестимулирующего фактора [1]. Изучению иммунобиологических эффектов действия данного пептида и посвящено настоящее исследование.

Цель исследования. Проанализировать иммунобиологический спектр активности синтетиче-

ского пептида активного центра гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора – ZP2 *in vitro* и *in vivo*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Проведен широкий спектр микробиологических, вирусологических, иммунологических и экспериментальных исследований *in vitro* и *in vivo* по изучению действия синтетического пептида активного центра ГМ-КСФ – ZP2 и созданного на его основе косметического средства АЦЕГРАМ.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследования показали, что синтетический пептид ZP2 обладает выраженным антимикробным действием. В различных концентрациях (от 1 мкг/мл до 100 мкг/мл) подавляет рост и размножение как музейных штаммов, так и клинических изолятов. При этом он обладает способностью блокировать биопленкообразование различных бактерий. Так пептид обладает антибактериальной активностью в отношении следующих видов бактерий: грамположительные – *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. hemolyticus*; грамотрицательные – *E. coli*, *Kl. pneumonia*, *Ps. aeruginosa*, *Acinetobacter*. Идентичными свойствами в отношении вышеуказанных видов бактерий обладает и созданное на основе пептида косметическое средство АЦЕГРАМ. При добавлении к клеточным перевиваемым культурам пептид активного центра ГМ-КСФ блокирует размножение ДНК- и РНК-содержащих вирусов (аденовирусов и вирусов парагриппа). Клиническое применение АЦЕГРАМа, так же выявило его выраженную эффективность при вирусных инфекциях. Так, в комплексной терапии пациентов, инфицированных вирусом Эпштейна-Барр, после 2-х курсов терапии у 90% пациентов вирус переставал персистировать в ротовой полости, что сопровождалось восстановлением активности клеток иммунной системы. Получены данные о его выраженном протективном и лечебном действии при острых вирусных инфекциях (ОРВИ и грипп). Как пептид, так и созданный на его основе косметический препарат обладает выраженным репаративным действием при ранах, ожогах, пролежнях, трофических язвах, особенно инфицированных ран и поражений кожи. Пептид и косметическое средство АЦЕГРАМ, обладают иммуностимулирующим действием. Стимулирует костномозговое кро-

ветворение (гранулоцитопоз), активность лимфоцитов, нейтрофилов, моноцитов, продукцию цитокинов клетками иммунной системы. За счет стимулирования гранулопоза обладает радиопротекторным действием [2].

Таким образом, созданные на основе синтетического пептида косметические средства АЦЕГРАМ в виде спрея и геля, помимо иммуностимулирующего и регенерирующего действий, обладают выраженными антибактериальными и противовирусными свойствами *in vivo* и могут быть рекомендованы для лечения иммунозависимых заболеваний, в том числе поражений кожи и слизистых бактериями и вирусами, для лечения раневых инфекций, ожогов, травм, трофических нарушений. Препарат может быть рекомендован для местного лечения в терапевтической и хирургической практике.

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. Зурочка А. В., Зурочка В. А., Добрынина М. А., Зueva Е. Б., Дукардт В. В., Грищенко В. А., Тяпаева Я. В., Черешнев В. А. Феномен наличия уникальной комбинации иммунобиологических свойств у синтетического аналога активного центра гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ). Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН. 2016. 2: 30 с. [Электр. ресурс] (URL: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2016-2/Articles/ZAV-2016-2.pdf>). [Zurochka A. V., Zurochka V. A., Dobrynina M. A., Zueva E. B., Dukardt V. V., Griushenko V. A., Tyapayeva Ya. V., Chereshev V. A. The phenomenon of the presence of a unique combination of immunobiological properties of the synthetic analogue of the active center of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF). Bulletin of the Orenburg Scientific Center UB RAS. 2016. 2: 30c. [Elektr. resource] (URL: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2016-2/Articles/ZAV-2016-2.pdf>)].
2. Аклеев А. В., Тряпицын Г. А., Симбирцев А. С., Аклеев А. А., Прыхин Е. А., Зурочка А. В. Экспериментальное обоснование применения синтетического пептида активного центра GM-CSF для лечения радиационно-индуцированной миелосупрессии. Цитокины и воспаление. 2014, Т. 13. № 3. С. 22–30. [Akleev A. V., Tryapitsyn G. A., Simbircev A. S., Akleev A. A., Pryakhin E. A., Zurochka A. V. Experimental justification of use of synthetic peptide of the active center GM-CSF for treatment of the radiation induced myelosuppression. Cytokines and inflammation. 2014, T. 13. № 3. P. 22–30].

IMMUNOBIOLOGICAL PROPERTIES OF SYNTHETIC ANALOGUES
OF GRANULOTSITARNO-MAKROFAGAL KOLONIESTIMULATING FACTOR
(GM-CSF)

© 2019 A. V. Zurochka^{1,2*}, V. A. Zurochka^{1,2}, M. A. Dobrynina¹,
L. O. Fomina¹, O. I. Zabkov¹, V. A. Gritsenko³

*E-mail: av_zurochka@mail.ru

¹Institute of Immunology and Physiology UrB RAS, Ekaterinburg, Russia;

²South-Ural State University (National Research University), Chelyabinsk, Russia;

³Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis UrB RAS, Orenburg, Russia

Received: 11.03.2019. Accepted: 22.03.2019

It was shown that peptide of the GM-CSF active center is the pluripotent colony-stimulating factor possessing the expressed antibacterial, antiviral, immunostimulating, reparation, radio tire-tread action of *in vitro* and *in vivo*. Similar properties the cosmetic preparation ACEGRAM created on its basis possesses.

Key words: peptide, the antibacterial, antiviral, immunostimulating, reparation, colony-stimulating activity

Authors:

Zurochka A. V., ✉ MD, professor, leader researcher of the laboratory of immunology of inflammation Institute of Immunology and Physiology of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russia; professor of the Department of food and biotechnology, of the South Ural state University (national research University), Chelyabinsk, Russia. E-mail: av_zurochka@mail.ru;

Zurochka V. A., MD, 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; professor of the Department of food and biotechnology, of the South Ural state University (national research University), Chelyabinsk, 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;

Zabkov O. 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, head of the laboratory of the Institute of cellular and intracellular symbiosis of the RAS, scientific Secretary of the Presidium of the Orenburg scientific center of the RAS, Orenburg, Russia.

КИНОЦИДИНЫ – ЦИТОКИНЫ, ОБЛАДАЮЩИЕ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ И ПРОТИВОВИРУСНОЙ АКТИВНОСТЬЮ

© 2019 г. В. А. Зурочка^{1,2*}, А. В. Зурочка^{1,2}, Л. О. Фомина¹,
М. А. Добрынина¹, О. И. Забков¹, В. А. Гриценко³

*E-mail: v_zurochka@mail.ru

¹ФБГУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения
Российской академии образования, Екатеринбург, Россия;

²ФГАОУ ВО «Южно-Уральский государственный университет (национальный
исследовательский университет)», Челябинск, Россия;

³ФБГУН «Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза» Уральского отделения
Российской академии наук, Оренбург, Россия

Поступила: 19.02.2019. Принята: 06.03.2019

Цель. Проанализировать характер влияния синтетического пептида активного центра гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ) – ZP2 на рост в жидкой питательной среде и биопленкообразование музейных и клинических штаммов бактерий, противовирусную активность *in vitro* и *in vivo*. Результаты. Было показано, что пептид активного центра ГМ-КСФ обладает выраженным антибактериальным действием в отношении широкого спектра грамположительных и грамотрицательных бактерий, снижая рост биопленкообразования и биомассы бактерий, аналогичным действием обладает и созданный косметический препарат АЦЕГРАМ. Одновременно данное средство обладает выраженным противовирусным действием в отношении ДНК- и РНК-содержащих вирусов *in vitro* и *in vivo*. Заключение. Созданные на основе синтетического пептида косметические средства Ацеграм в виде спрея и геля, могут быть рекомендованы для лечения поражений кожи и слизистых бактериями и вирусами, а пептид, на основе которого созданы данные средства, является по своим механизмам действия и свойствам классическим киноцидином.

Ключевые слова: синтетический пептид, антибактериальная активность, рост, формирование биопленок, противовирусная активность

DOI: 10.31857/S102872210006700-5

Адрес: 620049, Екатеринбург, Первомайская улица, 106, ФБГУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, Зурочка Владимир Александрович. Тел.: +79043017639.

E-mail: v_zurochka@mail.ru

Авторы:

Зурочка В. А., д.м.н., с.н.с. лаборатории иммунологии воспаления ФБГУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, Екатеринбург, Россия; профессор кафедры пищевых и биотехнологий, ФГАОУ ВО «Южно-Уральский государственный университет» (национальный исследовательский университет), Челябинск, Россия;

Зурочка А. В., д.м.н., профессор, в.н.с. лаборатории иммунологии воспаления ФБГУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, Екатеринбург, Россия; профессор кафедры пищевых и биотехнологий, ФГАОУ ВО «Южно-Уральский государственный университет» (национальный исследовательский университет), Челябинск, Россия;

Фомина Л. О., аспирант ФБГУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии образования, Екатеринбург, Россия;

Добрынина М. А., м.н.с. лаборатории иммунологии воспаления ФБГУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, Екатеринбург, Россия;

Забков О. И., аспирант ФБГУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии образования, Екатеринбург, Россия;

Гриценко В. А., д.м.н., профессор, заведующий лабораторией Института клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН, Оренбург, Россия.

АКТУАЛЬНОСТЬ

В настоящее время пристальное внимание привлекают хемокины и цитокины, обладающие антимикробным действием. Это связано с тем,

что классические антибиотики формируют быструю резистентность у большинства штаммов вызывающих гнойно-воспалительные заболевания. Такие цитокины получили название киноцидинов. К киноцидинам на сегодняшний день относятся α -хемокины CXCL1-1, -4, -6, -7, -8, -9, -10, -14, семейство β -хемокинов CCL1-1, -2, -5, -8, ряд авторов относят к ним и цитокины ИЛ-26, и INF- β [1, 2]. В последние годы появились данные по синтетическим пептидам активного центра ГМ-КСФ, которые обладают выраженной антибактериальной и противовирусной активностью [3]. Изучению антимикробных механизмов действия данных пептидов и посвящено настоящее исследование.

Цель исследования. Проанализировать характер влияния синтетического пептида активного центра гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ) – ZP2 на рост в жидкой питательной среде и биопленкообразование музейных и клинических штаммов бактерий, противовирусную активность *in vitro* и *in vivo*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Изучение антибактериальной активности синтетического пептида ГМ-КСФ на рост, размножение и биопленкообразование музейных и клинических штаммах различных грамположительные – *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. hemolyticus*; грамотрицательные – *E. coli*, *Kl. pneumonia*, *Ps. aeruginosa*, *Acinetobacter*. [4, 5]. Противовирусную активность проверяли на клеточных культурах (аденовирус и вирус парагриппа) *in vitro* и ПЦР-реакции (выявление вируса Эпштейна-Барр в слюне и крови у больных вирусной инфекцией, ассоциированной с вирусом Эпштейна-Барр).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследования показали, что синтетический пептид ZP2, в различных концентрациях (от 1 мкг/мл до 100 мкг/мл) подавляет рост и размножение как музейных штаммов, так и клинических изолятов. При этом он обладает способностью блокировать биопленкообразование Gr⁺ и Gr⁻ бактерий. Так пептид обладает антибактериальной активностью в отношении следующих видов бактерий: грамположительные – *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. hemolyticus*; грамотрицательные – *E. coli*, *Kl. pneumonia*, *Ps. aeruginosa*, *Acinetobacter*. Идентичными свойствами в отношении вышеуказанных видов бактерий обладает и созданное на основе пептида косметическое средство

АЦЕГРАМ. Степень выраженности антибактериального действия данного пептида варьирует в зависимости от штаммов и видов бактерий. Для подобных пептидов расшифрован основной механизм их действия на бактерии, а именно: формирование пор в бактериальных мембранах, а учитывая противовирусную активность, возможно, как и для ИЛ-26 связывание структур ДНК бактерий и через активацию TLR стимуляцию продукции ИНФ. Учитывая эти данные, важно было определить обладает ли пептид ГМ-КСФ противовирусной активностью и какой механизм антимикробной активности стоит за этими феноменами. Исследование показало, что при добавлении к клеточным перевиваемым культурам пептид активного центра ГМ-КСФ блокирует размножение ДНК и РНК-содержащих вирусов (аденовирусов и вирусов парагриппа). Клиническое его применение так же выявило его выраженную эффективность при вирусных инфекциях. Так, в комплексной терапии пациентов, инфицированных вирусом Эпштейна-Барр, после 2 курса терапии у 90% пациентов вирус переставал персистировать в ротовой полости, что сопровождалось восстановлением активности клеток иммунной системы. Механизм такого действия пептида может быть связан как с прямым противовирусным эффектом, так и активацией фагоцитарного и клеточного звеньев иммунной системы через специфические рецепторы к ГМ-КСФ, не исключается и третий механизм через активацию ИНФ α . Созданные на основе синтетического пептида косметические средства Ацеграм в виде спрея и геля, помимо иммуностимулирующего и регенерирующего действий, обладают выраженными антибактериальными и противовирусными свойствами *in vivo* и могут быть рекомендованы для лечения поражений кожи и слизистых бактериями и вирусами, а пептид на основе которого созданы данные средства является по своим механизмам действия и свойствам классическим киноцидином.

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. Kaplan A., Lee M. W., Wolf A. J., Limon J. J., Becker C. A., Ding M., Murali R., Lee E. Y., Liu G. Y., Wong G. C. L., Underhill D. M. Direct Antimicrobial Activity of IFN- β . The Journal of Immunology, 2017, 198: 4036–4045.
2. Meller S., Di Domizio J., Voo K. S., Friedrich H. C., Chamilos G, Ganguly D, Conrad C, Gregorio J, Le Roy D,

- Roger T., Ladbury J. E., Homey B., Watowich S., Modlin R. L., Kontoyiannis D. P., Liu Y. J., Arold S. T., Gilliet M. T(H)17 cells promote microbial killing and innate immune sensing of DNA via interleukin 26. *Nature immunology*, 2015, V.16 № 9. – p. 970–979).
3. Зурочка А. В., Зурочка В. А., Добрынина М. А., Зуева Е. Б., Дукардт В. В., Гриценко В. А., Тяпаева Я. В., Черешнев В. А. Феномен наличия уникальной комбинации иммунобиологических свойств у синтетического аналога активного центра гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ). *Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН*. 2016. 2: 30с. [Электр. ресурс] (URL: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2016-2/Articles/ZAV-2016-2.pdf>). [Zurochka A. V., Zurochka V. A., Dobrynina M. A., Zueva E. B., Dukardt V. V., Gritsenko V. A., Tyapaeva Ya. V., Chereshevnev V. A. The phenomenon of the presence of a unique combination of immunobiological properties of the synthetic analogue of the active center of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF). *Bulletin of the Orenburg Scientific Center UB RAS*. 2016. 2: 30c. [Elektr. resource] (URL: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2016-2/Articles/ZAV-2016-2.pdf>)]
 4. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования /Под ред. М. О. Биргера. М.: Медицина, 1982. 464 с. [Handbook of microbiological and virological research methods / Ed. M. O. Birger. M.: Medicine, 1982. 464 s.]
 5. Бухарин О. В., Гриценко В. А. Влияние *in vitro* препарата лейкоцитарного катионного белка “Интерцид” на *Escherichia coli*. *Антибиот. и химиотер.* 2000. 45 (1): 16–20. [Bukharin O. V., Gritsenko V. A. Effect of *in vitro* preparation of leukocyte cationic protein “Intercid” on *Escherichia coli*. *Antibiot and chemoter.* 2000. 45 (1): 16–20.]

CINETIDINE – CYTOKINES, ANTIBACTERIAL AND ANTIVIRAL ACTIVITY

© 2019 V. A. Zurochka^{1,2*}, A. V. Zurochka^{1,2}, L. O. Fomina¹,
M. A. Dobrynina¹, O. I. Zabkov¹, V. A. Gritsenko³

*E-mail: v_zurochka@mail.ru

¹Institute of Immunology and Physiology UrB RAS, Ekaterinburg, Russia;

²South-Ural State University (National Research University), Chelyabinsk, Russia;

³Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis UrB RAS, Orenburg, Russia

Received: 19.02.2019. Accepted: 06.03.2019

Purpose. To analyze the nature of the influence of the synthetic peptide of the active center of granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-KSF) – ZP2 on the growth in the liquid nutrient medium and biofilm formation of Museum and clinical strains of bacteria, antiviral activity *in vitro* and *in vivo*. **Results.** It was shown that the peptide of the active center GM-KSF has a pronounced antibacterial effect on a wide range of gram-positive and gram-negative bacteria, reducing the growth of biofilm formation and biomass of bacteria, and the created cosmetic drug ACEGRAM has a similar effect. At the same time sredstva has a strong antiviral effect against DNA- and RNA-containing viruses *in vitro* and *in vivo*. **Conclusion.** Created with synthetic peptide cosmetics Acegram spray and gel have strong antibacterial and antiviral properties *in vivo* and can be recommended for the treatment of lesions of skin and mucous bacteria and viruses and the peptide that generated the funds is in their mechanisms of action and properties of classical kinocidinum.

Key words: synthetic peptide, antibacterial activity, growth, formation of biofilms, antiviral activity

Authors:

Zurochka V. A., MD, 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; professor of the Department of food and biotechnology, of the South Ural state University (national research University), Chelyabinsk, Russia. **E-mail:** v_zurochka@mail.ru;

Zurochka A. V., MD, professor, leader researcher of the laboratory of immunology of inflammation Institute of Immunology and Physiology of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russia; professor of the Department of food and biotechnology, of the South Ural state University (national research University), Chelyabinsk, 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;

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;

Zabkov O. 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, head of the laboratory of the Institute of cellular and intracellular symbiosis of the RAS, scientific Secretary of the Presidium of the Orenburg scientific center of the RAS, Orenburg, Russia.

АКТИВАЦИЯ STING В Т КЛЕТКАХ ПРИВОДИТ К UPR И КЛЕТОЧНОЙ СМЕРТИ

© 2019 г. В. В. Илюха^{1,*}, Б. Ларкин², А. П. Прохорова¹,
А. Н. Полторак^{1,2}

*E-mail: karax911@mail.ru

¹ФГБОУ «Петрозаводский государственный университет», Петрозаводск, Россия

²Департамент Иммунологии, программа Иммунологии университета Тафтс, Бостон, США

Поступила: 17.04.2019. Принята: 29.04.2019

Несмотря на хорошо изученную роль адаптера STING в клеточном ответе на цитозольную ДНК, его вклад в активацию программируемой клеточной смерти не рассматривался на должном уровне. В ходе настоящего исследования показано, что активация STING в Т клетках приводит к продукции интерферонов первого типа, апрегуляции экспрессии группы интерферон-стимулирующих генов (ISG), а также клеточной смерти. Также показано, что клеточная смерть опосредуется UPR (Unfolded Protein Response).

Ключевые слова: STING, C57BL/6, UPR, интерфероны, программируемая клеточная смерть

DOI: 10.31857/S102872210006699-3

Адрес: 185910, Петрозаводск, пр. Ленина, д. 33, ФГБОУ ВО «Петрозаводский государственный университет», лаборатория молекулярной генетики врожденного иммунитета, Илюха Владимир Викторович.

Тел.: 8 (814-2) 79-53-22, 89210145715 (моб.).

E-mail: karax911@mail.ru

Авторы:

Илюха В. В., инженер лаборатории молекулярной генетики ФГБОУ ВО «Петрозаводский государственный университет», Петрозаводск, Россия;

Ларкин Б., исследователь департамента иммунологии, программы иммунологии университета Тафтс, Бостон, США;

Прохорова А. П., инженер лаборатории молекулярной генетики ФГБОУ ВО «Петрозаводский государственный университет», Петрозаводск, Россия;

Полторак А. Н., к.х.н., заведующий лабораторией молекулярной генетики ФГБОУ ВО «Петрозаводский государственный университет», Петрозаводск, Россия; заведующий лабораторией при департаменте иммунологии, программы иммунологии университета Тафтс, Бостон, США.

Распознавание клетками попавшей в цитоплазму бактериальной и вирусной ДНК является важным компонентом иммунного ответа на инфекцию, в котором основная роль отводится адаптеру STING, активирующему транскрипцию и продукцию интерферона первого типа (type I IFN).

Помимо участия в иммунном ответе на патогенную ДНК, STING также опосредует ответ на эндогенную ДНК, появляющуюся в цитоплазме

в результате повреждений ядра или митохондриального стресса, что может инициировать развитие опухолей и аутоиммунных заболеваний. С терапевтической точки зрения, STING также является мощным вакцинным адъювантом для развития и усиления иммунного ответа на опухолевые антигены. В целях STING-опосредованной онкоиммунотерапии он изучался исключительно в контексте активации макрофагов и дендритных клеток. В данном исследовании мы представляем доказательство активации STING в Т-клетках, что приводит к выработке IFN-I и активации Интерферон-Стимулирующих Генов (ISG). Эти клеточные ответы на ДНК до сих пор считались специфичными для миелоидных клеток, таких как макрофаги и дендритные клетки. Для детального изучения активации STING в Т-клетках было проведено секвенирование наивных C57BL/6 и дефицитных по STING CD3⁺ клеток, которые стимулировались агонистом STING DMXAA (Dimethylxanthenone-4-acetic Acid), как в отдельности, так и вместе с неспецифической активацией Т клеточного рецептора (TCR) анти-CD3/28, а так же макрофагов.

Анализ полученных данных об активации сигнальных путей показал STING-зависимую активацию апоптоза и каспазного каскада, а также снижение экспрессии IL-2 и генов клеточно-

го цикла. Интересно, что ни один из этих путей сигналинга, приводящих к смерти, не активируется с помощью DMXAA в макрофагах, что подтверждается данными сиквенса и позволяет предположить специфичность апоптоза, как ответа на ДНК именно для Т клеток. Немаловажно, что в отличие от макрофагов и дендритных клеток, в Т-клетках происходит значительная активация генов клеточного стресса и проапоптотических сигнальных путей, которые в конечном итоге приводят к гибели клеток. Эти результаты могут побудить к переоценке терапевтического использования агонистов STING,

так как они могут вызвать непредсказуемое на данный момент повреждение Т-клеток. С другой стороны, наши результаты показывают, что терапия на основе активации STING может быть применима для лечения патологий, опосредованных неконтролируемой пролиферацией Т-клеток. Возможным применением подобной терапии могут быть лимфопролиферативные нарушения, Т-клеточные лимфомы и отторжение трансплантата на основе Т-клеток.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 15-15-00100-П.

STING ACTIVATION IN T CELLS LEADS TO UPR AND CELL DEATH

© 2019 V. V. Ilyukha^{1,*}, B. Larkin², A. P. Prohorova¹,
A. N. Poltorak^{1,2}

*E-mail: karax911@mail.ru

¹Petrozavodsk State University, Petrozavodsk, Russia;

²Department of Immunology, Tufts University Immunology Program, Boston, USA

Received: 17.04.2019. Accepted: 29.04.2019

Despite well-studied role of the adapter STING in the cell response to cytosolic DNA, its contribution to the activation of programmed cell death was not considered at the proper level. In this study was shown that activation of STING in T cells leads to production of type I interferons, upregulation expression levels of the interferon-stimulating gene group (ISG), as well as cell death. It is also shown that cell death is mediated by UPR (Unfolded Protein Response).

Key words: STING, C57BL / 6, UPR, interferons, programmed cell death

Authors:

Ilyukha V. V., ✉ Engineer, Laboratory of Molecular Genetics, Petrozavodsk State University, Petrozavodsk, Russia.

E-mail: karax911@mail.ru;

Larkin B., Researcher, Department of Immunology, Immunology Program, Tufts University, Boston, USA;

Prohorova A. P., Engineer, Laboratory of Molecular Genetics, Petrozavodsk State University, Petrozavodsk, Russia;

Poltorak A. N., Ph.D. in Chemistry, Head of the Molecular Genetics Laboratory, Petrozavodsk State University, Petrozavodsk, Russia; Head of Laboratory, Department of Immunology, Immunology Program, Tufts University, Boston, USA.

ОСОБЕННОСТИ ПРОДУКЦИИ IL-4 И IL-10 ПРИ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ ВЕРХНЕГО ОТДЕЛА ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА

© 2019 г. Н. С. Ираклионова*, Э. Б. Белан, С. В. Туркина, Е. Л. Рудобаба

*E-mail: ins2904@rambler.ru

ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет»
Минздрава РФ, Волгоград, Россия

Поступила: 25.02.2019. Принята: 11.03.2019

Изучены особенности продукции сывороточных IL-4 и IL-10 при воспалительных заболеваниях верхнего отдела желудочно-кишечного тракта. Показано, что имеются различия в характере иммунологической реактивности в зависимости от наличия инфекции *H. pylori* и аллергических заболеваний.

Ключевые слова: интерлейкин-4, интерлейкин-10, иммуноглобулин E общий, желудочно-кишечный тракт, *Helicobacter pylori*

DOI: 10.31857/S102872210006698-2

Адрес: 400131 Волгоград, площадь Павших Борцов, д. 1, ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, Ираклионова Наталья Сергеевна. Тел. 89377405323 (моб.).

E-mail: ins2904@rambler.ru

Авторы:

Ираклионова Н. С., ассистент кафедры иммунологии и аллергологии ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, Волгоград, Россия;

Белан Э. Б., д.м.н., профессор, заведующий кафедрой иммунологии и аллергологии ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, Волгоград, Россия;

Туркина С. В., д.м.н., профессор кафедры внутренних болезней педиатрического и стоматологического факультетов ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, Волгоград, Россия;

Рудобаба Е. Л., ассистент кафедры иммунологии и аллергологии ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, Волгоград, Россия.

АКТУАЛЬНОСТЬ

Распространенность заболеваний гастродуоденальной зоны в России составляет 15–48% [1]. В основе воспалительных заболеваний желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) могут лежать различные причины: инфекции (в частности, *H. pylori*), извращенный иммунный ответ (аллергия), гельминтные инвазии и т.д. С другой сто-

роны, течение воспалительного процесса может также отличаться у больных с различным характером иммунологической реактивности.

Цель. Выявить особенности продукции IL-4 и IL-10 у пациентов с воспалительными заболеваниями верхнего отдела ЖКТ в зависимости от наличия аллергопатологии и *H. pylori*-инфекции.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование были включены 225 человек в возрасте от 18 до 40 лет. Критерии включения: наличие воспалительных заболеваний верхнего отдела ЖКТ до начала терапии; наличие консультации врача-аллерголога-иммунолога. Критерии исключения: менее 30 дней после острых воспалительных заболеваний; наличие хронических воспалительных процессов другой локализации (кроме аллергических заболеваний). I группу (n=30) составили *H. Pylori*-негативные пациенты, не имеющие аллергических заболеваний (A3-Np-). II группу (n=36) – *H. Pylori*-позитивные пациенты, не имеющие аллергопатологии (A3-Np+). III группу (n=31) – *H. Pylori*-негативные пациенты с отягощенным аллергоанамнезом (A3+Np-). IV группу (n=38 – *H. Pylori*-позитивные пациенты с отягощенным аллергоанам-

незом (A3+Hр+). V группу (группа сравнения 1; n=47) – практически здоровые пациенты без аллергических заболеваний и воспалительных заболеваний верхнего отдела ЖКТ. VI группа (группа сравнения 2; n=43) – пациенты с аллергическими заболеваниями без патологии ЖКТ. Определение содержания IL-4 и IL-10 в сыворотке крови проводили методом иммуноферментного анализа (ЗАО «Вектор-Бест»; Новосибирск, Россия), определение содержания общего IgE в сыворотке крови – с использованием наборов реагентов фирмы Siemens (Великобритания). Для сравнения абсолютных величин использовали критерий Уитни-Манна; для сравнения частот в независимых группах объектов исследования – критерий χ^2 . Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

При анализе показателей в группах сравнения между собой было выявлено, что, несмотря на отсутствие достоверных различий между ними по всем трем показателям, у пациентов с аллергическими заболеваниями чаще встречались повышенные значения показателей IL-10 и общего IgE (соответственно, 58,1% vs 36,2%, $p=0,0380$ и 51,2% vs 29,8%, $p=0,0398$). Несмотря на то, что в группе A3–Hр– не предполагалось определения повышенных значений общего IgE, она была сопоставима с группой сравнения 2 как по данному показателю (53,3% vs 51,2%, $p=0,8561$), так и по уровню IL-4 (соответственно, 66,7% vs 51,2%, $p=0,1904$). Возможно, в ее составе присутствовали пациенты, имеющие субклиническую сенсibilизацию или глистные инвазии. Вместе с тем, в данной группе не встречались повышенные значения IL-10, характерные для VI группы, что представляет интерес для дальнейшего обсуждения. Группа A3+Hр– также оказалась сопоставима с группой сравнения 2 по уровню общего IgE, IL-4 и IL-10 (соответственно, 61,3% vs 51,2%, $p=0,7773$; 70,9% vs 51,2%, $p=0,5926$; 61,3% vs 58,1%, $p=0,7868$) и отличалась от группы сравнения (соответственно, 61,3% vs 29,8%, $p=0,0062$; 70,9% vs 44,7%, $p=0,0232$; 61,3% vs 36,2%, $p=0,0305$), что делает логичным предположение об участии IgE-зависимых механизмов в развитии воспалительных заболеваний ЖКТ у данных пациентов. В I группе повышенные значения IL-4 встречались в 1,5 раза чаще, чем у Hр+ пациентов с аналогичными патологиями (66,7% vs 41,7%, $p=0,0443$), что соотносилось с повышенной частотой общего IgE, хотя по дан-

ному показателю достоверных различий обнаружено не было (53,3% vs 36,1%, $p=0,1636$). При сочетании гастропатологии с аллергическими заболеваниями сохранялась та же закономерность с более высокой частотой повышенных значений общего IgE и IL-4 у Hр-пациентов (соответственно, 61,3% vs 36,8%, $p=0,0447$ и 70,9% vs 42,1%, $p=0,0173$), как и у пациентов без аллергических заболеваний, но в отличие от них пациенты с комбинированной патологией имели различия по частоте повышенных значений уровня IL-10 (61,3% vs 23,7%, $p=0,0017$). Патогенез аллергических заболеваний связан с преимущественным Th2-фенотипом иммунного ответа, одним из ключевых цитокинов которого является IL-4. Данный цитокин, являясь кофактором пролиферации покоящихся В-лимфоцитов, индуцирует в них синтез IgE, что было продемонстрировано в ходе работы. В то же время IL-10, действуя через ингибирование презентации антигена и дегрануляции тучных клеток, угнетает выработку провоспалительных Th2-цитокинов [2]. *H. pylori*-инфекция, способствуя увеличению количества CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ регуляторных клеток, синтезирующих IL-10, также угнетает Th2-тип иммунного ответа [3]. Вероятно, в результате этого в IV группе не наблюдалось значительного повышения уровня IL-10 вследствие сдвига ответа в Th1-сторону при наличии *H. pylori*.

ВЫВОДЫ

Таким образом, воспалительные заболевания верхнего отдела ЖКТ характеризуются разным характером иммунологической реактивности в зависимости как от наличия аллергических заболеваний, так и от наличия *H. pylori*-инфекции.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Караева В. Ю. Частота кровотечений при эрозивно-язвенных поражениях верхних отделов пищеварительного тракта у детей. Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2013, 1, 15–19. [Karaeva V. Yu. Bleeding frequency in erosive and ulcerative lesions of the upper digestive tract in children. Experimental and clinical gastroenterology. 2013, 1, 15–19].
2. Faith A., Singh N., Farooque S., Dimeloe S., Richards D. F., Lu H., Roberts D., Chevetton E., Lee T. H., Corrigan C. J., Hawrylowicz C. M. T cells producing the anti-inflammatory cytokine IL-10 regulate allergen-specific Th2 responses in human airways. Allergy. 2012, 67(8), 1007–1013.

3. Hussain K., Letley D. P., Greenaway A. B., Kenefeck R., Winter J. A., Tomlinson W., Rhead J., Staples E., Kaneko K., Atherton J. C., Robinson K. *Helicobacter pylori*-mediated protection from allergy is associated with IL-10-secreting peripheral blood regulatory T-cells. *Frontiers in Immunology*. 2016, 7, 1–15.

THE FEATURES OF IL-4 AND IL-10 PRODUCTION IN UPPER GASTROINTESTINAL INFLAMMATORY DISEASES

© 2019 N. S. Iraklionova*, E. B. Belan, S. V. Turkina, E. L. Rudobaba

*E-mail: ins2904@rambler.ru

Volgograd State Medical University, Volgograd, Russia

Received: 25.02.2019. Accepted: 11.03.2019

The peculiarities of the IL-4 and IL-10 production have been studied in patients with upper gastrointestinal inflammatory diseases. It has been revealed that the serum level of these cytokines depends on presence or absence of allergic diseases and *H.pylori* infection.

Key words: interleukin-4, interleukin-10, total immunoglobulin E, gastrointestinal tract, *Helicobacter pylori*

Authors:

Iraklionova N. S., ✉ Professor's assistant of Immunology and Allergology Department Volgograd State Medical University, Volgograd, Russia. **E-mail:** ins2904@rambler.ru;

Belan E. B., MD, Professor, Head of Immunology and Allergology Department Volgograd State Medical University, Volgograd, Russia;

Turkina S. V., MD, Professor of Internal Diseases for Pediatric and Dental Faculties Volgograd State Medical University, Volgograd, Russia;

Rudobaba E. L., Professor's assistant of Immunology and Allergology Department Volgograd State Medical University, Volgograd, Russia.

РОЛЬ NGAL ДЛЯ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ПОВРЕЖДЕНИЯ ПОЧЕК В ПЕДИАТРИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ

© 2019 г. Л. Р. Кальметьева*, Л. Г. Ибрагимова, Д. Д. Прольгина

*E-mail: imun-lab@mail.ru

ГБУЗ «Республиканская детская клиническая больница» Минздрава РБ, Уфа, Россия

Поступила: 15.03.2019. Принята: 26.03.2019

Как известно, маркерами повреждения почек (ПП) принято считать протеинурию, повышенный уровень креатинина сыворотки крови, снижение скорости клубочковой фильтрации, количества выделяемой мочи. При хронической болезни почек данные маркеры выявляют уже в позднюю стадию поражения почек, когда лекарственная терапия не всегда эффективна и процесс поражения почек необратим. В последние годы особое внимание уделяется поиску новых предикторов острого и рецидивов хронического ПП, что способствовало бы выявлению преморбидных патологических изменений в почках, определению степени и характера поражения различных отделов нефрона, оценке выраженности воспаления и интенсивности фиброгенеза. Одним из ранних маркеров ПП является липокалин, ассоциированный с желатиназой нейтрофилов или липокалин-2(NGAL).

Ключевые слова: NGAL, u-NGAL, острое почечное повреждение

DOI: 10.31857/S102872210006697-1

Адрес: 450106, Уфа, ул. Степана Кувыкина 98, ГБУЗ «Республиканская клиническая больница» Минздрава РБ, иммунологическая лаборатория с отделением клинической иммунологии, Кальметьева Линара Ринатовна.

Тел.: +7(347) 2290839

E-mail: imun-lab@mail.ru

Авторы:

Кальметьева Л. Р., к.м.н., аллерголог-иммунолог ГБУЗ «Республиканская детская клиническая больница» Минздрава РБ, Уфа, Россия;

Ибрагимова Л. Г., аллерголог-иммунолог ГБУЗ «Республиканская детская клиническая больница» Минздрава РБ, Уфа, Россия;

Прольгина Д. Д., к.м.н., аллерголог-иммунолог ГБУЗ «Республиканская детская клиническая больница» Минздрава РБ, Уфа, Россия.

АКТУАЛЬНОСТЬ

NGAL – neutrophil gelatinase-associated lipocalin, липокалин, ассоциированный с желатиназой нейтрофилов. Впервые этот протеин был выделен из супернатанта активированных нейтрофилов человека, поэтому получил название NGAL. Более детальные исследования показали, что NGAL выходит в плазму из вторичных гранул активированных нейтрофилов, но синтезироваться может в разных органах и типах клеток. NGAL является компонентом острой фазы вос-

палительного ответа. К основным функциям белка можно отнести противодействие бактериальным инфекциям и стимулирование пролиферации поврежденных клеток, особенно, эпителиальных [1]. В зависимости от нормы или патологии, NGAL экспрессируется и секретируется в больших количествах различными клетками, находящимися в состоянии стресса, например, вследствие инфекций, воспаления.

При повреждении ренальных канальцев происходит повышение уровня NGAL как в сыворотке (в 7–16 раз), так и в моче (в 25–1000 раз). При остром почечном повреждении (ОПП) NGAL синтезируется в дистальном нефроне. Четко показано, что при ОПП в восходящем колоне петли Генле и в собирательных трубках происходит быстрое и массовое повышение (в 1000 раз) синтеза мРНК, кодирующей NGAL [2, 3, 4, 5]. Установлено, что местом первичного ишемического ПП являются клетки проксимальных канальцев, в лизосомальном компартменте которых обнаруживаются повышенные уровни NGAL. В результате выраженного синтеза и секреции липокалина-2 в дистальном нефроне именно «ренальный» вариант NGAL составляет наибольшую фракцию в моче [2].

Цель работы: определение концентрации NGAL в моче (u-NGAL) для ранней диагностики ОПП и прогнозирования течения хронических почечных заболеваний у детей.

За период с 2013 по 2019 гг. на базе ГБУЗ «Республиканская детская клиническая больница» Минздрава РБ, г. Уфы нами было обследовано 332 пациента. Определение уровня мочевого экскреции NGAL проводилось у следующих категорий больных:

- у пациентов реанимационного отделения с гемолитико-уремическим синдромом (ГУС), сепсисом, геморрагической лихорадкой с почечным синдромом (ГЛПС) с целью раннего прогнозирования ОПП;

- у больных отделения трансплантации органов, в качестве раннего, предиктора необходимости проведения диализа в первую неделю после трансплантации почки и восстановления функции трансплантата;

- у пациентов нефрологического отделения с острыми и хроническими заболеваниями почек для прогнозирования прогрессирования заболевания, а также определения нефротоксического действия цитостатиков;

- у детей нефрологического и урологического отделений с инфекциями мочевыводящих путей (ИМВП) в качестве маркера воспаления.

Известно, что пограничные уровни u-NGAL, позволяющие с оптимальной чувствительностью и специфичностью предсказывать ОПП у детей составляют 100–135 нг/мл.

В результате проведенных исследований установлено, что наиболее высокие уровни показателя отмечались у больных с ГУС, ГЛПС и ренальными осложнениями при сепсисе. Анурия, как правило, развивалась при значениях NGAL 1500 нг/мл и выше (55 пациентов). Максимальные цифры достигали 6000 нг/мл.

У части пациентов (29 детей) уровень показателя колебался в диапазоне 300–1000 нг/мл. В данную группу вошли больные с ГУС, ГЛПС, ренальными осложнениями при сепсисе, хроническими заболеваниями почек (ХЗП) с менее выраженными показателями нарушения функции почек (креатинин, мочевины, скорость клубочковой фильтрации).

У 197 пациентов уровень u-NGAL составил от 3 до 150 нг/мл. В эту группу вошли пациенты с ХЗП, в том числе получающих цитостатики, ИМВП, тубулоинтерстициальным нефритом (ТИН).

У большинства обследованных нами больных повышение уровня мочевого экскреции NGAL

коррелировало с увеличением сывороточного креатинина. Однако у некоторых детей с ТИН, острым постстрептококковым гломерулонефритом, рецидивом хронического гломерулонефрита на фоне гиперпродукции исследуемого белка мы не выявили изменения уровня сывороточного креатинина. Наиболее неблагоприятным, с точки зрения прогноза, являлось сочетание повышения NGAL с наличием маркеров гломерулярного поражения почек, таким как протеинурия, гематурия, гипертензией. У таких пациентов, как правило, развивалась почечная недостаточность, требующая проведения заместительной терапии. У больных с ХЗП мы наблюдали быстрый переход заболевания в терминальную стадию.

В ряде случаев проводился мониторинг исследуемого показателя – уровень u-NGAL определялся от 2 до 6 раз с различным временным интервалом. Особенности динамики данного маркера явились в большинстве случаев выраженное падение значений NGAL в течение 1–2 суток, например, при таких заболеваниях как ГЛПС, сепсис, ГУС, острый тубулоинтерстициальный нефрит лекарственной этиологии, что может свидетельствовать об эффективности лечения и благоприятном прогнозе.

Длительно сохраняющееся умеренное повышение u-NGAL определялось у пациентов с III–IV стадией ХЗП. У пациентов с терминальной хронической почечной недостаточностью уровень мочевого экскреции NGAL был, как правило, в пределах референсных значений.

Таким образом, NGAL является высокочувствительным и надежным маркером острого повреждения почек и может быть использован в качестве предиктора тубулярной дисфункции при различных заболеваниях. Особого внимания заслуживает возможность использования этого показателя для определения субклинического ПП.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. *Kjeldsen L., Johnsen A.H., Sengelov H., Borregaard N.* Isolation and primary structure of NGAL, a novel protein associated with human neutrophil gelatinase // *J. Biol. Chem.* 1993; 268: 10425–10432. (Типовая, англоязычная).
2. *Mishra J., Ma Q., Prada A., Mitsnefes M., Zahedi K., Yang J., Barasch J., Devarajan P.* Identification of neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a novel early urinary biomarker for ischemic renal injury // *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 2003; 14: 2534–2543. (Типовая, англоязычная).
3. *Jaya Mishra, Catherine Dent, Ridwan Tarabishi, Mark M Mitsnefes, Qing Ma, Caitlin Kelly, Stacey M Ruff,*

- Kamyar Zahedi, Mingyuan Shao, Judy Bean, Kiyoshi Mori, Jonathan Barasch, Prasad Devarajan.* Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as biomarker for acute renal injury after cardiac surgery // *Lancet.* 2005; 365: 1231–1238. (Типовая, англоязычная).
4. *Mishra J., Mori K., Devarajan P., Kelly C.* Kidney NGAL is a novel early marker of acute injury following transplantation // *Pediatr. Nephrol.* 2006; 21: 856–863. (Типовая, англоязычная).
5. *Wagener G., Jan M., Kim M., Mori K., Barasch J. M., Sladen R. N., Lee H. T.* Association between increases in urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin and acute renal dysfunction after adult cardiac surgery // *Anesthesiology.* 2006; 105: 485–491. (Типовая, англоязычная).

THE ROLE OF NGAL FOR PREDICTING RENAL DAMAGE IN PEDIATRIC PRACTICE

© 2019 L. R. Kalmetyeva*, L. G. Ibrahimova, D. D. Prolygina

*E-mail: imun-lab@mail.ru

Republican Children Clinical Hospital, Ufa, Russia

Received: 15.03.2019. Accepted: 26.03.2019

As it is known, serum creatinine and glomerular filtration rate are considered to be markers of kidney damage. In chronic kidney disease, these markers reveal a late stage of kidney damage, when drug therapy is not always effective and the process of kidney damage is irreversible. In recent years, special attention has been paid to the search for predictors of acute and relapses of chronic renal damage, which could lead to the detection of premorbid pathological changes in the kidneys, to determine the nature and differentiate the defeat of various parts of the nephron, to establish the stage of the process, to assess the severity of inflammation and the intensity of fibrogenesis. One of these early markers is NGAL are investigated.

Key words: NGAL, u-NGAL, acute renal injury

Authors:

Kalmetyeva L. R., ☒ PhD, allergist-immunologist of Republican Children Clinical Hospital, Ufa, Russia. **E-mail:** imun-lab@mail.ru;
Ibragimova L. G., allergist-immunologist of Republican Children Clinical Hospital, Ufa, Russia;
Prolygina D. D., PhD, allergist-immunologist of Republican Children Clinical Hospital, Ufa, Russia.

ВЛИЯНИЕ КУРИНЫХ ЖЕЛТОЧНЫХ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ НА ВЫНОСЛИВОСТЬ МЫШЕЙ

© 2019 г. В. С. Каплин^{1*}, Г. М. Сысоева², Л. В. Гридунова³,
Н. И. Кулешова³, Л. Р. Лебедев²

*E-mail: kaplin_vs@vector.nsc.ru

¹ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Россия, Кольцово, Новосибирская область, Россия;

²Институт медицинской биотехнологии ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Бердск,
Новосибирская область, Россия;

³ЗАО «Алтайвитамины», Бийск, Россия

Поступила: 15.03.2019. Принята: 01.04.2019

Методом биологического тестирования проведена оценка адаптогенных свойств лиофильно высушенных иммуноглобулинов, выделенных из желтков куриных яиц (IgY). В экспериментах на животных в тесте «вынужденное плавание» было показано, что предварительное пятикратное и десятикратное пероральное введение желточных куриных IgY в дозе 2 мг на мышь приводит к достоверному увеличению выносливости животных.

Ключевые слова: IgY, желточные иммуноглобулины, вынужденное плавание, выносливость, мышши

DOI: 10.31857/S102872210006696-0

Адрес: 630559, р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия, ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, отдел биоинженерии, Каплин Владимир Сергеевич.
Тел-факс: 7 (383) 336-74-09; 8 952 940-52-16 (моб.)
E-mail: kaplin_vs@vector.nsc.ru

Авторы:

Каплин В. С., к.б.н., старший научный сотрудник отдела биоинженерии ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Россия, Кольцово, Новосибирская область, Россия;

Сысоева Г. М., ведущий научный сотрудник отдела биологических исследований ИМБТ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Россия, Бердск, Новосибирская область, Россия;

Гридунова Л. В., главный технолог ЗАО «Алтайвитамины» Россия, Бийск, Алтайский край, Россия;

Кулешова Н. И., к.т.н., директор по развитию предприятия ЗАО «Алтайвитамины», Россия, Бийск, Алтайский край, Россия;

Лебедев Л. Р., д.б.н., зав. лабораторией нуклеиновых кислот и рекомбинантных белков ИМБТ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Россия, Бердск, Новосибирская область, Россия.

АКТУАЛЬНОСТЬ

Важное место в производстве лекарственных и диагностических средств занимает направление по получению биологически активных веществ, в частности, иммуноглобулинов, обла-

дающих иммуномодулирующей и адаптогенной активностью. Совершенствование производства лечебных и диагностических иммуноглобулинов до сих пор является актуальной проблемой. В этом направлении особое внимание заслуживает рассмотрение возможности получения препаратов на основе желточных иммуноглобулинов (IgY) от различных видов птиц. Возможность получения большого количества желточных антител не инвазивным способом делает птиц выгодным поставщиком иммунного материала для изготовления иммунобиологических препаратов, позволяющих увеличить рентабельность производства.

Целью нашего исследования было установить влияние куриных желточных иммуноглобулинов, полученных от не иммунизированных кур несушек, на выносливость лабораторных животных, выявляемую в тесте вынужденного плавания.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В экспериментах использовались яйца не иммунизированных кур породы Леггорн белый.

Желточные IgY выделяли по методике Hodek P., et al. [1]. Очистку IgY осуществляли с помощью стерилизующей фильтрации раствора через фильтр Millipore с диаметром пор 0,22 мкм. Препарат был лиофильно высушен в сублимационной сушилке с объёмом камеры 0,4 м³, остаточным давлением менее 10 Па. Оценку чистоты IgY проводили с помощью электрофореза в 15%-ном SDS-полиакриламидном геле в денатурирующих условиях. Содержание белка оценивали путем анализа полос, полученных в результате электрофореза, с использованием компьютерной программы Gel-Proanalyzer, Ver 3.1. Исследование адаптогенной активности проводили в тесте «вынужденное плавание» [2] Эксперименты выполнены на мышах линии BALB/c. Препарат вводили ежедневно в течение 5 и 10 суток, внутривенно через зонд, в объёме 0,1 мл, 2 мг на мышь. Через сутки после последнего введения проводили тестирование животных по методике «вынужденное плавание с грузом».

Экспериментальные данные обрабатывали методами вариационной статистики с помощью пакета программ «Statgraphics, Vers.5.0» (Statistical Graphics Corp., USA). Для оценки значимости отличий использовали t-критерий Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

В статье приведены результаты исследования влияния лиофильно высушенного препарат IgY на физическую работоспособность экспериментальных животных. Чистота препарата составляла 96%. Оценку работоспособности проводили на модели принудительного плавания с 5% нагрузкой от массы тела животного. В результате исследования установлено, что при 5- и 10-кратном введении препарата время максимального плавания возросло по сравнению с контролем в группе животных, которым препарат вводили

в дозе 2 мг на мышь. Проведенные измерения показали, что самки исходно менее выносливы к нагрузке плаванием, чем самцы. Самцы показали более высокие результаты, и они достоверно отличались от результатов в контрольных группах. При 5-кратном введении препарата самцы опытной группы показали время удержания на воде 3,05 мин, контрольной – 1,83 мин., то есть превышение в 1,6 раз. При 10-кратном введении препарата удержания на воде у самцов в опытной группе составило 3,0 мин, в контрольной – 1,4 мин, то есть превышение в 2,1 раза. В результате исследования установлено, что 5- и 10-кратное введение препарата вызывало достоверное увеличение времени максимального плавания мышей самцов опытных групп, по сравнению с контрольными.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что курсовое применение IgY способствует увеличению значений показателей физической работоспособности, что является подтверждением высокой биологической активности и перспективности дальнейшего фармакологического исследования препарата. Предлагаемый препарат может быть перспективным средством для восстановления иммунитета и физических сил спортсменов, ослабленных людей после тяжёлой работы, болезни.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Hodek, P. Trefil, J. Simunek, J. Hudecek, M. Stiborova. Optimized Protocol of Chicken Antibody (IgY) Purification Providing Electrophoretically Homogeneous Preparations. *Int. J. Electrochem. Sci.* 2013, 8, 113–124.
2. Karkischenko V.N., Fokin Yu.V., Kazakova L.Kh., Alimkina O.V., Kasinskaya N.V. Methods of studying physiological functions of laboratory animals for preclinical researches in sports medicine. *Biomeditsina (Rus.)* 2012, 4, 15–21.

THE EFFECT OF CHICKEN YOLK IMMUNOGLOBULIN Y ON INCREASE IN EDURANCE OF MICE

© 2019 V. S. Kaplin^{1*}, G. M. Sysoeva², L. V. Gridunova³,
N. I. Kuleshova³, L. R. Lebedev²

*E-mail: kaplin_vs@vector.nsc.ru

¹FBRI State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Rospotrebnadzor,
Koltsovo, Novosibirsk Region, Russia;

²Institute of Medical Biotechnology FBRI State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector»,
Rospotrebnadzor, Berdsk, Novosibirsk Region, Russia;

³ZAO Altaivitaminy, Biysk, Altai region, Russia

Received: 15.03.2019. **Accepted:** 01.04.2019

The evaluation of adaptogenic properties of lyophilized immunoglobulins Y isolated from chicken yolks was performed with biological testing methods (IgY). In animal experiments, in the forced swimming test (FST), a prior five- and ten-fold oral administration of yolk chicken IgY in a dose of 2 mg per mouse led to a relevant increase in animal endurance.

Key words: IgY, yolk immunoglobulins, forced swimming, endurance

Authors:

Kaplin V. S., ☒ Pb D., SRF, FBRI SRC VB «Vector» Rospotrebnadzor, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russia.

E-mail: kaplin_vs@vector.nsc.ru;

Sysoeva G. M., SRF, FBRI SRC VB «Vector» Rospotrebnadzor, Berdsk, Novosibirsk Region, Russia;

Gridunova L. V., chief technologist, ZAO Altaivitaminy, Altai region, Biysk, Russia;

Kuleshova N. I., Ph D., chief development officer, ZAO Altaivitaminy, Altai region, Biysk, Russia;

Lebedev L. R., Dr. habil., Head of the laboratory of Nucleic Acids and Recombinant Proteins, FBRI SRC VB «Vector» Rospotrebnadzor, Berdsk, Novosibirsk Region, Russia.

СВОЙСТВА СУБПОПУЛЯЦИЙ НАТУРАЛЬНЫХ КИЛЛЕРОВ ЧЕЛОВЕКА, ОБЛАДАЮЩИХ МАРКЕРАМИ АДАПТИВНЫХ КЛЕТОК

©2019 г. П. А. Кобызева, М. А. Стрельцова, С. А. Ерохина,
Е. И. Коваленко*

*E-mail: lenkovalen@mail.ru

¹ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина
и Ю. А. Овчинникова», РАН, Москва, Россия

Поступила: 15.03.2019. Принята: 27.03.2019

Натуральные киллеры относят к лимфоцитам врожденного иммунитета, поскольку они способны проявлять спонтанную противоопухолевую активность без предварительной активации. Согласно недавним исследованиям, у человека некоторые вирусные инфекции, в первую очередь, цитомегаловирусная инфекция, ассоциированы с увеличенным, по сравнению с неинфицированными людьми, количеством циркулирующих НК-клеток с фенотипом CD57⁺NKG2C⁺. Предполагается, что клетки данной субпопуляции обладают характеристиками адаптивных клеток и иммунологической памятью к инфекции HCMV. Данная работа посвящена изучению свойств субпопуляций НК-клеток человека, отобранных по маркерам CD57 и NKG2C, при стимуляции IL-2 и мембраносвязанным IL-21.

Ключевые слова: адаптивные НК-клетки, цитомегаловирус, HCMV, CD57⁺NKG2C⁺ субпопуляция, HLA-DR, K562-mbIL21, противоопухолевая иммунотерапия

DOI: 10.31857/S102872210006695-9

Адрес: 117997, улица Миклухо-Маклая, дом 16/10, ФГБУН «Институт биоорганической химии им. акад. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова», РАН, лаборатория клеточных взаимодействий, Коваленко Елена Ивановна.
Тел.: +7(915)2445626 (моб.).

E-mail: lenkovalen@mail.ru

Авторы:

Кобызева П. А., бакалавр, лаборатория клеточных взаимодействий, ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова», РАН, Москва, Россия;

Стрельцова М. А., м.н.с. лаборатории клеточных взаимодействий, ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова», РАН, Москва, Россия;

Ерохина С. А., аспирант, лаборатория клеточных взаимодействий, ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова», РАН, Москва, Россия;

Коваленко Е. И., к.б.н., с.н.с. лаборатории клеточных взаимодействий, ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова», РАН, Москва, Россия.

Натуральные киллеры (НК-клетки) традиционно определяются как лимфоциты врожденного иммунитета из-за их способности быстро

и эффективно элиминировать поврежденные или трансформированные клетки организма без предварительной активации. В отличие от Т- и В-лимфоцитов, НК-клетки обладают иным механизмом распознавания мишени, называемым «missing self recognition», который не требует участия антиген-специфических рецепторов и запускается при отсутствии молекул главного комплекса гистосовместимости первого класса на клетках-мишенях. Это позволяет использовать натуральные киллеры в качестве эффективного противоопухолевого агента без риска развития активной формы болезни «трансплантат против хозяина» [1].

Несмотря на видимый прогресс в области НК-клеточной иммунотерапии, такие факторы как малая численность НК-клеток в крови, низкий пролиферативный потенциал активированных клеток, ингибирование цитотоксического ответа при взаимодействии с клетками некоторых опухолей ограничивают эффективность их применения в клинической практике. Альтернативный путь для поиска новых стра-

тегий в области лечения рака появился после обнаружения адаптивных свойств у определенной группы НК-клеток. Было показано, что эти клетки проявляют увеличенную функциональную активность при взаимодействии с опухолевыми клетками [2].

Данная субпопуляция НК-клеток характеризуется высокой экспрессией активирующего лектин-подобного рецептора CD94/NKG2C и маркера терминальной дифференцировки CD57. Численность этой субпопуляции в периферической крови пациентов возрастает под действием цитомегаловирусной инфекции (HCMV) [3].

Клетки субпопуляции CD57⁺NKG2C⁺ специализируются на высокоэффективном иммунном ответе на определенные раздражители, и обладают следующими свойствами: сниженной натуральной цитотоксичностью и чувствительностью к цитокинам IL-12, IL-18, продуцируемым клетками врожденного иммунитета, и увеличенной антителозависимой цитотоксичностью и продукцией IFN- γ в ответ на соответствующие стимулы, а также длительным персистированием в организме (от 4 месяцев до 1 года) [4]. Совокупность этих функциональных особенностей соответствует клеткам памяти и позволяет считать, что именно субпопуляция НК-клеток NKG2C⁺CD57⁺ обладает свойствами адаптивности.

Данная работа посвящена изучению пролиферативной активности и фенотипических различий субпопуляций НК-клеток человека, отобранных по маркерам CD57 и NKG2C. Выделение НК-клеток осуществляли методом отрицательной магнитной сепарации из мононуклеаров периферической крови здоровых доноров. Было проведено сравнение клеток, полученных из общей популяции НК-клеток, так и разделенных методом клеточной сортировки на субпопуляции CD57⁻NKG2C⁻, CD57⁻NKG2C⁺, CD57⁺NKG2C⁻, CD57⁺NKG2C⁺. Клетки культивировали в присутствии 100 ед./мл IL-2 с добавлением фидерных клеток K562, несущих на своей поверхности мембраносвязанный IL-21 (K562-mbIL21). Фенотипический анализ поверхностной экспрессии маркеров CD56, NKG2C, HLA-DR, CD57, NKp30, NKp46, NKG2A, CD16, KIR2DL2/DL3 проводился с помощью метода проточной цитометрии с использованием флуоресцентномеченых антител. Пролиферативную

активность НК-клеток оценивали по уровню свечения витального красителя CFSE.

На разделенных субпопуляциях было показано, что наивысшим пролиферативным потенциалом обладали малодифференцированные CD57-клетки, а из позитивных по CD57 субпопуляций наибольшую пролиферативную способность имели клетки NKG2C⁺. Хотя НК-клетки не относятся к антигенпрезентирующим, в общей популяции НК-клеток *ex vivo* наблюдалось небольшое количество HLA-DR⁺ -клеток. Наибольшим уровнем экспрессии HLA-DR обладали NKG2C-позитивные НК-клетки. Оценка динамики уровня экспрессии NKG2C и HLA-DR в общей популяции и разделенных НК-клетках выявила рост уровня экспрессии HLA-DR, при этом, максимальные значения были зарегистрированы в клетках NKG2C⁺. При культивировании в условиях стимуляции в общей популяции наблюдалось увеличение количества клеток, позитивных по NKp30, NKp46, NKG2A и уменьшение количества НК-клеток с фенотипом CD57⁺, CD16⁺ или KIR⁺.

Таким образом, стимуляция IL-2 и фидерными клетками K562-mbIL-21 активирует НК-клетки, позитивные по маркеру NKG2C, в том числе и клетки субпопуляции CD57⁺NKG2C⁺. NKG2C⁺-НК-клетки обладают высокой пролиферативной способностью и демонстрируют повышенный активационный статус. Полученные результаты могут быть использованы при получении высокоактивированных и пролиферирующих субпопуляций НК-клеток с целью их дальнейшего применения в иммунотерапии рака.

Работа поддержана Российским научным фондом, грант № 19-15-00439.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Li Y., Yin J., Li T., Huang S., Yan H., Leavenworth J., Wang X. NK cell-based cancer immunotherapy: from basic biology to clinical application. *Sci China Life Sci.* 2015, 58(12), 1233–45.
2. Peng H., Tian Z. Natural Killer Cell Memory: Progress and Implications. *Front Immunol.* 2017, 8, 1143.
3. Goodier M.R., Jonjić S., Riley E.M., Juranić Lisnić V. CMV and natural killer cells: shaping the response to vaccination. *Eur J Immunol.* 2018, 48(1), 50–65.
4. Kovalenko E. I., Streltsova M. A., Kanevskiy L. M., Erokhina S. A., Telford W. G. Identification of Human Memory-Like NK Cells. *Curr Protoc Cytom.* 2017, 79, 9.50.1–9.50.11.

**PROPERTIES OF HUMAN NATURAL KILLER CELL SUBPOPULATIONS
EXPRESSING MARKERS OF ADAPTIVE CELLS**

© 2019 P. A. Kobyzeva, M. A. Streltsova, S. A. Erokhina,
E. I. Kovalenko*

*E-mail: lenkovalen@mail.ru

*Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry,
Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*

Received: 15.03.2019. **Accepted:** 27.03.2019

Natural killer cells are attributed to lymphocytes of innate immunity for their ability of spontaneous antitumor activity without prior activation. However, recent studies have shown that some viral infections, such as human cytomegalovirus, can cause an increase in the number of NK cells with the phenotype CD57⁺NKG2C⁺ compared to healthy donors. It is assumed that cells of this subpopulation have some properties of adaptivity and immunological memory to HCMV infection. This paper is devoted to the study of properties of human NK-cell subpopulations selected for the markers CD57 and NKG2C, when stimulated with IL-2 and membrane-bound IL-21.

Key words: adaptive NK-cells, cytomegalovirus, HCMV, CD57⁺NKG2C⁺ subpopulation, HLA-DR, K562-mbIL-21, cancer immunotherapy

Authors:

Kobyzeva P. A., bachelor, Laboratory of Cell Interactions, Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia;

Streltsova M. A., Junior Researcher of Laboratory of Cell Interactions, Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia;

Erokhina S. A., PhD Student, Laboratory of Cell Interactions, Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia;

Kovalenko E. I., ✉ PhD, Senior Researcher of Laboratory of Cell Interactions, Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia. **E-mail:** lenkovalen@mail.ru

МИКРОБИЦИДНЫЙ ЭФФЕКТ СЕКРЕТОРНЫХ ПРОДУКТОВ НЕЙТРОФИЛОВ ПО ОТНОШЕНИЮ К ПРЕДСТАВИТЕЛЯМ РЕЗИДЕНТНОЙ И УСЛОВНО-ПАТОГЕННОЙ ФЛОРЫ ТЕЛА ЧЕЛОВЕКА

© 2019 г. Е. В. Колбина*, Ю. С. Шишкова, Е. А. Мезенцева, И. А. Колбин

*E-mail: kaplech@mail.ru

ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет»
Минздрава России, Челябинск, Россия

Поступила: 14.03.2019. Принята: 25.03.2019

Проведено исследование 50 образцов супернатантов нейтрофилов интактных и активированных *S. aureus* (штамм 209), *E. coli* (штамм М-17), *Lactobacterium spp.*, *Bifidobacterium spp.* Определено, что индукция нейтрофилов *in vitro* представителями резидентной и условно-патогенной флоры тела человека приводит к секреции биологически активных продуктов неодинакового состава. Так, при взаимодействии нейтрофилов с *Lactobacterium spp.*, и, в большей степени, *Bifidobacterium spp.*, в супернатантах значительно повышается уровень оксида азота, при этом содержание пероксидазы и каталазы не изменяется. Это сопровождается достоверным повышением микробицидности секреторных продуктов нейтрофилов по отношению к *S. aureus* и *E. coli*, не влияя при этом на жизнеспособность *Lactobacterium spp.* и *Bifidobacterium spp.*

Ключевые слова: нейтрофилы, супернатант, бактерицидная активность

DOI: 10.31857/S102872210006694-8

Адрес: 454092, г. Челябинск, ул. Воровского, 64, ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России, кафедра микробиологии, вирусологии, иммунологии и клинической лабораторной диагностики. Колбина Екатерина Викторовна.
Тел./факс: 8(351)2327456, +79128933420 (моб.).
E-mail: kaplech@mail.ru.

Авторы:

Колбина Е. В., к.м.н., ст. преп. кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии и клинической лабораторной диагностики, ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России, Челябинск, Россия;

Шишкова Ю. С., д.м.н., проф. кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии и клинической лабораторной диагностики, ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России, Челябинск, Россия;

Мезенцева Е. А., к.м.н., доц. кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии и клинической лабораторной диагностики, ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России, Челябинск, Россия;

Колбин И. А., асс. кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии и клинической лабораторной диагностики, ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России, Челябинск, Россия.

АКТУАЛЬНОСТЬ

Нейтрофилы – основные клетки врожденной иммунной системы. Их основная функция – уни-

чтожение патогенных микроорганизмов и ограничение их распространения в организме. Под активацией нейтрофилов подразумеваются быстро наступающие изменения физиологической и биохимической активности последних под действием внешнего сигнала. Подготовленный нейтрофил может оказывать свое действие на объект, вызвавший его активацию, различными способами, в том числе, выделять наружу биологически активные продукты, оказывая микробицидный эффект внеклеточно [1, 2].

Цель работы. Оценить микробицидный эффект секреторных продуктов нейтрофилов по отношению к представителям резидентной и условно-патогенной флоры тела человека.

ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ МЕТОДЫ

Секреторные продукты (супернатанты) получали из взвеси нейтрофилов периферической крови 10 здоровых доноров, выделенных на двойном градиенте растворов фикола-верографина с плотностью верхнего слоя – 1,075–1,077,

нижнего – 1,093–1,095 [2]. Нейтрофилы довели до концентрации 5×10^6 клеток/мл. Для получения супернатантов нейтрофилов их активировали взвесью суточной культуры контрольных штаммов микроорганизмов *Staphylococcus aureus* (штамм 209), *Escherichia coli* (штамм М-17) (Коллибактерин сухой, Микроген НПО, Россия), *Lactobacterium spp.* (Лактобактерин сухой, «Им-Био», г. Нижний Новгород), *Bifidobacterium spp.* (Бифидумбактерин сухой, ЗАО «Экополис», г. Ковров), доведенных до концентрации 1 млрд. микробных тел в 1 мл по стандарту мутности (БАК-10, ООО «Ормед», г. Екатеринбург). 0,1 мл бактериальной взвеси соединяли с 1 мл взвеси нейтрофилов, инкубировали 30 минут при температуре 37 °С. Часть нейтрофилов оставляли без активации (контроль). Пробирки центрифугировали при скорости 3000 оборотов в минуту в течение 10 минут для получения супернатанта [2]. В супернатантах нейтрофилов определяли содержание нитратов, активность пероксидазы, активность каталазы, бактерицидную активность [2]. У полученных супернатантов нейтрофилов определяли бактерицидный эффект к *S. aureus* (штамм 209), *E. coli* (штамм М-17), *Lactobacterium spp.* и *Bifidobacterium spp.* Полученные результаты исследования обрабатывали с использованием пакета статистических программ Statistica for Windows 6.0.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

В результате проведенных исследований определили, что содержание оксида азота в супернатантах нейтрофилов, активированных *Lactobacterium spp.*, и, в большей степени, *Bifidobacterium spp.*, значительно превосходило аналогичные показатели интактных нейтрофилов и нейтрофилов, активированных *S. aureus* и *E. coli*.

После взаимодействия нейтрофилов с изучаемыми микроорганизмами уровень активности пероксидазы и каталазы в супернатантах не изменялся.

При определении микробицидной активности супернатантов интактных нейтрофилов на тестируемые штаммы бактерий отмечалось значительное снижение содержания всех видов микроорганизмов в пробе.

Активация нейтрофилов *S. aureus* усиливала микробицидный потенциал супернатантов нейтрофилов по отношению к *E. coli*. Активация нейтрофилов *E. coli* приводила к снижению микробицидности супернатанта по отношению к *S. aureus* и *E. coli*, при этом практически не влия-

ла на рост *Lactobacterium spp.* и *Bifidobacterium spp.* После взаимодействия нейтрофилов с *Lactobacterium spp.* и *Bifidobacterium spp.* нейтрофилы секретировали вещества, бактерицидный эффект которых был более выражен по отношению к *S. aureus* и *E. coli*, чем микробицидный эффект продуктов интактных нейтрофилов, при этом по отношению к *Lactobacterium spp.* и *Bifidobacterium spp.* такой супернатант обладал низкой микробицидностью.

КРАТКОЕ ОБСУЖДЕНИЕ

Таким образом, индукция нейтрофилов *in vitro* различными бактериальными агентами приводит к секреции биологически активных продуктов неодинакового состава [3]. Так, при взаимодействии нейтрофилов с *Lactobacterium spp.*, и, в большей степени, *Bifidobacterium spp.*, в супернатантах значительно повышается уровень оксида азота, при этом содержание пероксидазы и каталазы не изменяется. Это сопровождается достоверным повышением микробицидности продуктов секреции нейтрофилов по отношению к *S. aureus* и *E. coli*, не влияя при этом на жизнеспособность *Lactobacterium spp.* и *Bifidobacterium spp.*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Долгушин И. И., Андреева Ю. С., Мезенцева Е. А., Савочкина А. Ю., Плеханова Е. В., Свиридов М. А., Пешикова М. В. Нейтрофилы регулируют формирование микробиоценоза слизистых оболочек. Медицинская иммунология. 2006, 8; 2–3, 135–136. [Dolgushin I. I., Andreeva Yu. S., Mezentseva E. A., Savochkina A. Yu., Plekhanova E. V., Sviridov M. A., Peshikova M. V. Neutrophils regulate the formation of microbiocenosis of the mucous membranes. Medical Immunology. 2006, 8; 2–3, 135–136].
2. Долгушин И. И., Андреева Ю. С., Савочкина А. Ю. Нейтрофильные внеклеточные ловушки и методы оценки функционального статуса нейтрофилов. Издательство РАМН, Москва 2009, 208. [Dolgushin I. I., Andreeva Yu. S., Savochkina A. Yu. Neutrophil extracellular traps and methods for assessing the functional status of neutrophils. Publishing house RAMS, Moscow 2009, 208].
3. Плеханова Е. В. Влияние факторов цервикального секрета (факультативной и резидентной флоры, муцина) на функциональные свойства нейтрофилов: дис. ... канд. мед. наук. Челябинск, 2007. [Plekhanova E. V. The influence of factors of cervical secretion (optional and resident flora, mucin) on the functional properties of neutrophils: dissertation for the degree of candidate of medical sciences. Chelyabinsk 2007].

MICROBICIDAL EFFECT OF SECRETORY PRODUCTS OF NEUTROPHILS IN RELATION TO REPRESENTATIVES OF RESIDENT AND CONDITIONALLY PATHOGENIC MICROFLORA OF A HUMAN BODY

© 2019 E. V. Kolbina*, Yu. S. Shishkova, E. A. Mezentseva,
I. A. Kolbin

*E-mail: kaplech@mail.ru

Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «South-Ural State
Medical University» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Chelyabinsk, Russia

Received: 14.03.2019. Accepted: 25.03.2019

A study of 50 samples of intact and activated neutrophil supernatants from *S. aureus* (strain 209), *E. coli* (strain M-17), *Lactobacterium spp.*, *Bifidobacterium spp.* has been conducted. It has been determined that *in vitro* induction of neutrophils by representatives of the resident and conditionally pathogenic microflora of the human body leads to secretion of biologically active products of different composition. Thus, the interaction of neutrophils with *Lactobacterium spp.* and, to a greater extent, *Bifidobacterium spp.* significantly increases the level of nitric oxide in supernatants, while the content of peroxidase and catalase does not change. This is accompanied by a significant increase in the microbicide of neutrophil secretion products in relation to *S. aureus* and *E. coli*, without affecting the viability of *Lactobacterium spp.* and *Bifidobacterium spp.*

Key words: neutrophils, supernatant, bactericidal activity

Authors:

Kolbina E. V., ✉ PhD M.S., Senior Teacher of the Department of Microbiology, Virology, Immunology and Clinical Laboratory Diagnostics, Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Medical Education «South Ural State Medical University» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Chelyabinsk, Russia. **E-mail:** kaplech@mail.ru;

Shishkova Yu. S., MD M.S., Professor of the Department of Microbiology, Virology, Immunology and Clinical Laboratory Diagnostics, Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Medical Education «South Ural State Medical University» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Chelyabinsk, Russia;

Mezentseva E. A., PhD M.S., Docent of the Department of Microbiology, Virology, Immunology and Clinical Laboratory Diagnostics, Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Medical Education «South Ural State Medical University» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Chelyabinsk, Russia;

Kolbin I. A., Assistant of the Department of Microbiology, Virology, Immunology and Clinical Laboratory Diagnostics, Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Medical Education «South Ural State Medical University» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Chelyabinsk, Russia.

ИССЛЕДОВАНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ХАРАКТЕРИСТИК НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ЖЕЛЕЗОСОДЕРЖАЩИХ НАНОЧАСТИЦ ФЕРРИГИДРИТА

© 2019 г. О. А. Коленчукова^{1,3*}, С. В. Столяр^{2,3}, Л. П. Ладынина²

*E-mail: Kalina-chyikova@mail.ru

¹ФГБНУ Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения РАН» обособленное подразделение Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера, Минобрнауки РФ, Красноярск, Россия;

²ФГБНУ Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения РАН» обособленное подразделение институт физики им. Л. В. Киренского, Минобрнауки РФ, Красноярск, Россия;

³ФГАОУ ВО «Сибирский федеральный университет», Минобрнауки РФ, Красноярск, Россия

Поступила: 15.03.2019. Принята: 03.04.2019

Исследование посвящено определению влияния магнитных железосодержащих наночастиц (МЖНЧ) на функциональное состояние нейтрофильных гранулоцитов крови. Объектом исследования являлись нейтрофильные гранулоциты (НГ) (n=34). Было сформировано 3 группы: контрольная (без инкубации с МЖНЧ); во второй группе при воздействии синтетических магнитных железосодержащих наночастиц ферригидрита (СМЖНЧ), в третьей группе – синтетических магнитных железосодержащих наночастиц ферригидрита, покрытых природным полисахаридом – арабиногалактаном (СМЖНЧА). Концентрации наночастиц ферригидрита составляли 5 мг/мл и 20 мг/мл. Исследовали ранний и поздний хемилюминесцентный ответ. Выявлено, что функциональная активность НГ при воздействии разных экспериментальных типов МЖНЧ изменяется в зависимости от концентрации, при увеличении количества воздействующих наночастиц наблюдается однонаправленная реакция со снижением активности клеток.

Ключевые слова: нейтрофильные гранулоциты, магнитные железосодержащие наночастицы, функциональная активность

DOI: 10.31857/S102872210006693-7

Адрес: 660022, Красноярск, ул. Партизана Железняка, д. 3Г, ФГБУ «Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук» обособленное подразделение Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера, Минобрнауки РФ, Коленчукова Оксана Александровна. Тел./факс: +7(962)0701710.

E-mail: Kalina-chyikova@mail.ru

Авторы:

Коленчукова О. А., д.б.н., доцент, в.н.с. НИИ МПС ФИЦ КНЦ СО РАН, г. Красноярск, Россия;

Столяр С. В., д.ф.-м.н., доцент, с.н.с. Института физики им Л. В. Киренского ФИЦ КНЦ СО РАН, г. Красноярск, Россия;

Ладынина Л. П., н.с. Института физики им Л. В. Киренского ФИЦ КНЦ СО РАН, г. Красноярск, Россия.

Наиболее приоритетным направлением использования наноматериалов является медицина. Магнитные железосодержащие нано-

частицы ферригидрита обладают уникальной особенностью – биосовместимость с живыми организмами, поскольку ферригидрит входит в состав и формируется в ядре белкового комплекса – ферритина. Этот белковый комплекс присутствует в органах практически всех живых организмах и участвует в метаболизме железа. Использование магнитных железосодержащих наночастиц ферригидрита в медицине связано с тем, что данные наночастицы могут доставить лекарственные препараты в определенную клетку или ткань с помощью магнитного поля. При этом магнитные наночастицы, используемые в клинических испытаниях, как показывают исследования, могут оказывать не только положительное воздействие, но и отрицательное, которое может выражаться в токси-

ческом, канцерогенном и мутагенном действии на живой организм в целом [1, 2, 3]. Таким образом, целью исследования является определение влияния магнитных железосодержащих наночастиц (МЖНЧ) на функциональное состояние нейтрофильных гранулоцитов крови.

МЕТОДЫ И МАТЕРИАЛЫ

Объектом исследования являлись нейтрофильные гранулоциты (НГ), выделенные из венозной крови относительно здоровых доноров ($n=34$). Было сформировано три группы, одна из которых являлась контрольной (без инкубации с МЖНЧ). Во второй группе нейтрофильные гранулоциты подвергались воздействию синтетических магнитных железосодержащих наночастиц ферригидрита (СМЖНЧ), в третьей группе – синтетических магнитных железосодержащих наночастиц ферригидрита, покрытых природным полисахаридом – арабиногалактаном (СМЖНЧА). Концентрации наночастиц ферригидрита составляли 5 мг/мл и 20 мг/мл. Исследовали ранний (измеряли реакцию непосредственно после внесения МЖНЧ в пробу) и поздний (пробу инкубировали с МЖНЧ в термостате в течение 45 минут) хемилюминесцентный ответ. Статистическую обработку базы данных осуществляли с помощью пакета прикладных программ Statistica.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование воздействия различных концентраций СМЖНЧ и СМЖНЧА на функциональную активность НГ крови показало снижение интенсивности, времени выхода на пик и площади под кривой люминолом и люцигенин-зависимой хемилюминесценции при воздействии 20 мг/мл СМЖНЧ и 5 мг/мл СМЖНЧА относительно контроля, как в спонтанном процессе, так и при зимозан-индуцированной реакции. Обнаружено что функциональная активность НГ в ответ на СМЖНЧ и СМЖНЧА без инкубации выше, чем в пробах после инкубации. Так, происходит увеличение таких показателей ХЛ как, времени выхода на максимум и индекса активации. Таким образом, при исследовании спонтанной и зимозан-индуцированной люминол- и люцигенин-зависимой ХЛ в пробах с добавлением СМЖНЧ и СМЖНЧА в концентрациях 5 мг/мл и 20 мг/мл наблюдается снижение интенсивности свечения относительно контрольной группы. При сравнении раннего ответа

ХЛ в двух экспериментальных группах, выявлено, что при добавлении СМЖНЧА в минимальной концентрации – 5 мг/мл, происходит увеличение площади под кривой и интенсивности свечения при снижении времени выхода на максимум относительно проб с СМЖНЧ. Так, при добавлении к НГМЖНЧ в концентрации 5 мг/мл наблюдается повышение времени выхода на пик, интенсивности ХЛ и индекса активации в группе с СМЖНЧ относительно СМЖНЧА. При сравнении показателей функциональной активности НГ двух экспериментальных групп с добавлением МЖНЧ в концентрации – 20 мг/мл обнаружили увеличение интенсивности и площади под кривой в спонтанном и зимозан-индуцированном процессе люминол-зависимой ХЛ при добавлении СМЖНЧА относительно проб с СМЖНЧ. При сравнении позднего хемилюминесцентного ответа при индукции НГСМЖНЧА с концентрацией 20 мг/мл выявлено увеличение интенсивности, площади под кривой и времени выхода на пик, как в спонтанном, так и в зимозан-индуцированном процессах относительно воздействия СМЖНЧ. При этом, такая однонаправленная реакция проявляется как в люминол-зависимой ХЛ, так и в люцигенин-зависимом процессе.

Таким образом, функциональная активность НГ изменяется в зависимости от концентрации разных экспериментальных типов МЖНЧ, при увеличении количества воздействующих наночастиц наблюдается однонаправленная реакция со снижением активности клеток. При инкубации НГ с МЖНЧ отмечено снижение функциональной активности клеток. Сравнительный анализ позволил выявить, что СМЖНЧ, имеющие поверхностное покрытие, оказывают стимулирующее действие на функциональную активность НГ. Активирование НГ СМЖНЧ без полисахаридной капсулы обнаружили только при раннем хемилюминесцентном ответе при воздействии концентрации 5 мг/мл. В других реакциях раннего и позднего хемилюминесцентного ответа НГ проявляли большую активность в ответ на наночастицы покрытые арабиногалактаном.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Balaev D. A., Dubrovskii A. A., Bayukov O. A., Stolyar S. V., Iskhakov R. S., Krasikov A. A., Yaroslavlsev R. N., Ladygina V. P. The effect of low-temperature heat treatment on the magnetic properties of biogenic ferrihydrite nanoparticles. *Technical Physics Letters*. 2015, 41(7), 705–709.

2. Balaev D. A., Dubrovskii A. A., Semenov S. V., Bayukov O. A., Stolyar S. V., Iskhakov R. S., Krasikov A. A., Ishchenko L. A., Ladygina V. P. Magnetic properties and the mechanism of formation of the uncompensated magnetic moment of antiferromagnetic ferrihydrite nanoparticles of a bacterial origin // Journal of Experimental and Theoretical Physics. 2014, 119(3), 479–487.
3. Iskhakov R. S., Chekanova L. A., Stolyar S. V., Vazhenina I. G. Spin-wave resonance in multilayer fenip/pd films // Bulletin of the Russian Academy of Sciences: Physics. 2014, 78(4), 328–329.

THE STUDY OF THE FUNCTIONAL CHARACTERISTICS OF NEUTROPHILIC GRANULOCYTES WHEN EXPOSED TO IRON-CONTAINING NANOPARTICLES FERRIHYDRITE

© 2019 O. A. Kolenchukova^{1,3*}, S. V. Stolyar^{2,3}, L. P. Ladygina²

*E-mail: Kalina-chyikova@mail.ru

¹Research Institute of Medical Problems of the North, Federal Research Centre «Krasnoyarsk Research Centre», Siberian Division of the Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russia;

²L. V. Kirensky Institute of Physics, Federal Research Centre «Krasnoyarsk Research Centre», Siberian Division of the Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russia;

³Siberian Federal University, Krasnoyarsk, Russia

Received: 15.03.2019. Accepted: 03.04.2019

The study is devoted to determining the effect of magnetic iron-containing nanoparticles on the functional state of blood neutrophils. The object of the study was neutrophil granulocytes (n=34). 3 groups were formed: control (without incubation); in the second group – exposed to synthetic magnetic iron-containing ferrihydrite nanoparticles; in the third group – synthetic magnetic iron-containing ferrihydrite nanoparticles coated with natural polysaccharide – arabinogalactane. The concentration of nanoparticles ferrihydrite was 5 mg/ml and 20 mg/ml. Explored the early and late chemiluminescent response. It was found that the functional activity of cells under the influence of different experimental types of iron-containing nanoparticles varies depending on the concentration, with an increase in the number of acting nanoparticles, a unidirectional reaction with a decrease in cell activity is observed.

Key words: neutrophilic granulocytes, magnetic iron-containing nanoparticles, functional activity

Authors:

Kolenchukova O. A., ✉ MD, PhD, researcher, Federal Research Centre, Scientific Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk, Russia;

660022 Krasnoyarsk, Partizana Zelezniakast. 3G, **E-mail:** kalina-chyikova@mail.ru;

Stolyar S. V., MD, PhD, researcher, Siberian Federal University, Krasnoyarsk, Russia;

Ladinina L. P., researcher, Federal Research Centre, Krasnoyarsk, Russia.

БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЕ И ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЕ МАРКЕРЫ СЛЮНЫ ДЛЯ ОЦЕНКИ УРОВНЯ РАБОТОСПОСОБНОСТИ СПОРТСМЕНОВ

© 2019 г. О. А. Коленчукова^{1,2*}, И. И. Гвоздев¹, Е. Н. Бирюкова²,
О. С. Сутормин², Л. В. Степанова², С. В. Смирнова¹

*E-mail: Kalina-chyikova@mail.ru

¹ФГБНУ Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского
отделения РАН» обособленное подразделение Научно-исследовательский институт медицинских
проблем Севера, Минобрнауки РФ, Красноярск, Россия;

²ФГАОУ ВО «Сибирский федеральный университет», Минобрнауки РФ, Красноярск, Россия

Поступила: 15.03.2019. Принята: 29.03.2019

Целью исследования являлось определение биолюминесцентных и хемилюминесцентных маркеров физического статуса спортсменов. Для проведения эксперимента были отобраны 2 группы спортсменов с преобладающими аэробными (лыжники и конькобежцы, n=16) и анаэробными (саночники и бобслеисты, n=16) типами нагрузки, в возрасте от 16 до 30 лет. Исследования проводили во время PWC170 тестирования. Сбор образцов слюны и крови проводили до и при нагрузке W1, W2, PWC170. Определение про- и антиоксидантов оценивали с помощью хемилюминесцентного метода. Определение физиологического статуса проводили биолюминесцентным методом. Таким образом, у спортсменов с преобладающими аэробными нагрузками обнаружен дисбаланс в работе про-окси- и антиоксидантов, повышена активность выработки прооксидантов и снижена – антиоксидантов, мы видим декомпенсаторные изменения, угнетение активности антиоксидантных механизмов, и усиление выработки активных форм кислорода. Обратная ситуация наблюдается у спортсменов с преобладающей анаэробной нагрузкой. С помощью биолюминесцентного тестирования найдены достоверные различия между группами спортсменов с преобладающими аэробными и анаэробными нагрузками, а также с разными спортивными квалификациями.

Ключевые слова: хемилюминесценция, биолюминесценция, физический статус, работоспособность

DOI: 10.31857/S102872210006692-6

Адрес: 660022 Красноярск, ул. Партизана Железняка, д. 3Г, ФГБУ «Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук» обособленное подразделение Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера, Минобрнауки РФ, Коленчукова Оксана Александровна. Тел./факс: +7(962)0701710.

E-mail: Kalina-chyikova@mail.ru

Авторы:

Коленчукова О. А., д.б.н., доцент, ведущий научный сотрудник НИИ МПС ФИЦ КНЦ СО РАН, Красноярск, Россия;

Гвоздев И. И., младший научный сотрудник НИИ МПС ФИЦ КНЦ СО РАН, Красноярск, Россия;

Бирюкова Е. Н., магистр 1-го года ИФБиТ СФУ, г. Красноярск, Россия;

Сутормин О. С., м.н.с. лаборатории биолюминесцентных биотехнологий СФУ, Красноярск, Россия;

Степанова Л. В., к.б.н., доцент кафедры биофизики СФУ, Красноярск, Россия;

Смирнова С. В., д.м.н., профессор НИИ МПС ФИЦ КНЦ СОРАН, Красноярск, Россия.

Клиническое использование бактериальной биолюминесценции имеет много преимуществ, включая простоту и скорость. Бактериальное биолюминесцентное тестирование уже нашло широкое применение в фундаментальных и прикладных исследованиях. Биолюминесцентные тесты основаны на изменении активности биферментной системы NADH: FMN-оксидоредуктаза + люцифераза под влиянием биологических жидкостей человека. Так же не менее

актуальным для решения этой задачи является создание и внедрение инновационных неинвазивных методов контроля состояния организма человека, которые крайне необходимы, в том числе и для восстановительной и спортивной медицины. Удобным объектом неинвазивного метода является слюна [1–4].

Целью исследования являлось определение биолюминесцентных и хемилюминесцентных маркеров слюны для оценки физического статуса спортсменов.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для проведения эксперимента были отобраны 2 группы спортсменов с преобладающими аэробными (лыжники и конькобежцы, $n=16$) и анаэробными (саночники и бобслеисты, $n=16$) типами нагрузки, в возрасте от 16 до 30 лет. Исследования проводили во время PWC170 тестирования. Сбор образцов слюны и крови проводили до и при нагрузке W1, W2, PWC170. Определение про- и антиоксидантов оценивали с помощью хемилюминесцентного метода. Определение физиологического статуса проводили биолюминесцентным методом.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование активности прооксидантов в крови до и после нагрузочных проб возрастающей мощности обнаружило достоверные различия в группах спортсменов-саночников, бобслеистов, а также лыжных и конькобежных видов спорта. Так, тесты показали достоверное увеличение интенсивности первичных и вторичных форм кислорода в группе спортсменов-лыжников и конькобежцев относительно бобслеистов и саночников ($P<0,001$), что говорит об активизации метаболических процессов в клетках и их высоких резервных способностях для синтеза активных форм кислорода в группах спортсменов с преобладающей аэробной нагрузкой. Исследование активности антиоксидантов в слюне и сыворотке крови обнаружило достоверные различия между группами спортсменов с аэробной и анаэробной нагрузками. Так, у спортсменов с преобладающей аэробной нагрузкой (лыжники и конькобежцы) активность каталазы снижена относительно спортсменов-бобслеистов и саночников ($P<0,004$). Низкая активность каталазы прослеживается в динамике W1, W2, PWC170 нагрузочных тестов на велоэргометре. Оценка люциферазного индекса при

исследовании проб взятых до PWC170 тестирования, а также при нагрузках W1, W2, PWC170 показала снижение интенсивности свечения слюны у спортсменов в группе с преобладающей анаэробной нагрузкой относительно группы аэробного типа ($P<0,001$; $P=0,004$; $P=0,016$; $P=0,038$ соответственно). Исследование интенсивности свечения слюны взятой у спортсменов при нагрузке PWC170 обнаружило низкий уровень ингибирования биолюминесцентной системы при высокой работоспособности и увеличение степени ингибирования при снижении работоспособности ($P=0,035$; $P=0,02$; $P=0,004$). Так же, в результате тестирования слюны с помощью биолюминесцентного метода был выявлен повышенный уровень ингибирования биферментной системы у спортсменов с квалификацией кандидата в мастера спорта при нагрузках W1, W2, PWC170. Далее, снижение ингибирования происходит у спортсменов с квалификацией мастера спорта. И, самый низкий уровень ингибирования биолюминесцентной системы обнаружен у спортсменов с 1 взрослым разрядом ($P=0,018$; $P=0,027$; $P<0,001$ соответственно). Таким образом, у спортсменов с преобладающими аэробными нагрузками обнаружен дисбаланс в работе про-окси- и антиоксидантов, повышена активность выработки прооксидантов и снижена — антиоксидантов, мы видим декомпенсаторные изменения, угнетение активности антиоксидантных механизмов, и усиление выработки активных форм кислорода. Обратная ситуация наблюдается у спортсменов с преобладающей анаэробной нагрузкой. С помощью биолюминесцентного тестирования найдены достоверные различия между группами спортсменов с преобладающими аэробными и анаэробными нагрузками, а также с разными спортивными квалификациями.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Красноярского краевого фонда науки в соответствии с исследовательским проектом «Разработка экспрессного интегрального метода оценки функционального состояния спортсмена с целью эффективного управления тренировочным процессом для достижения высокого спортивного результата».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Bezrukikh A., Esimbekova E., Nemtseva E., Kratasyyuk V., Shimomura O. Gelatin and starch as stabilizers of the coupled enzyme system of luminous bacteria NADH: FMN-oxidoreductase-luciferase. Anal. Bioanal. Chem., 2014, 406, 5743–5747.

2. Nunes, L.A.S.; Macedo, D.V.D. Saliva as a diagnostic fluid in sports medicine: potential and limitations. *J. Bras. Patol. Med. Lab.* 2013, 49, 247–255.
3. Степанова Л. В., Вышедко А. М., Коленчукова О. А., Жукова Г. В., Кратасюк В. А. Использование биолюминесцентного тестирования слюны в оценке физической подготовленности спортсменов разной квалификации // Сибирское медицинское обозрение. 2017, 6, 63–69. [Stepanova L. V.; Vyshedko A. M.; Kolenchukova O. A.; Zhukova G. V.; Kratasjuk V. A. Use of bioluminescent saliva testing in evaluating of physical preparedness of athletes with different qualifications. *Siberian Medical Review*. 2017, 6, 63–69].
4. Pingitore A., Lima G. P., Mastorci F., Quinones A., Iervasi G., Vassalle C. Exercise and oxidative stress: potential effects of antioxidant dietary strategies in sports. *Nutrition*, 2015, 31(7–8), 916–22.

BIOLUMINESCENT CHEMILUMINESCENT MARKERS FOR ASSESSMENT OF PHYSICAL STATUS OF ATHLETES FOR DETERMINATION PERFORMANCE LEVEL

© 2019 O. A. Kolenchukova^{1,2*}, I. I. Gvozdev¹, E. N. Birukova²,
O. S. Sutormin², L. V. Stepanova², S. V. Smirnova¹

*E-mail: Kalina-chyikova@mail.ru

¹Federal Research Centre Scientific Research Institute of Medical Problems of the North,
Krasnoyarsk, Russia;

²Institute of Fundamental Biology and Biotechnology, Siberian Federal University, Krasnoyarsk, Russia

Received: 15.03.2019. Accepted: 29.03.2019

The aim of this study was to determine the activity bioluminescent chemiluminescent markers of saliva, serum and blood phagocytes as markers of the physical status of athletes. 2 groups of athletes, with the prevailing aerobic (skiers and ice-skaters, n=16) and anaerobic (sliders and bobsled racers, n=16) types of exercise, aged from 16 to 30 years old, were selected. Studies were carried out under the PWC170 testing. Saliva and blood samples were collected before and under W1, W2, PWC170 types of loads. The determination of activity of pro- and antioxidants was registered using the chemiluminescent method. The determination of the physiologic status was registered using the bioluminescent method. The imbalance in the activity of pro-oxy- and antioxidants was detected for athletes with prevailing aerobic loads. For these athletes were measured increased production of pro-oxidants and decreased the production of antioxidants. In addition, irreversible changes, inhibition of the activity of antioxidant mechanisms, and increased production of reactive oxygen intermediates were received. The opposite situation is observed in athletes with a predominant anaerobic load. Results of bioluminescent bioassay show significant differences between athletes with prevailing aerobic and anaerobic types of loads, as well as with different sports qualifications.

Key words: chemiluminescence, bioluminescence, physical status, performance

Authors:

Kolenchukova O. A., ✉ MD, PhD, researcher, Federal Research Centre, Scientific Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk, Russia;

660022 Krasnoyarsk, Partizana Zelezniakast. 3G, E-mail: kalina-chyikova@mail.ru;

Gvozdev I. I., researcher, Federal Research Centre Scientific Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk, Russia;

Birukova E. N., student Siberian Federal University, Krasnoyarsk, Russia;

Sutormin O. S., researcher, Siberian Federal University, Krasnoyarsk, Russia;

Stepanova L. V., PhD, Siberian Federal University, Krasnoyarsk, Russia;

Smirnova S. V., MD, PhD, professor Federal Research Centre Scientific Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk, Russia.

МОДЕЛЬ ПСОРИАЗОПОДОБНОГО ПОРАЖЕНИЯ КОЖИ У МЫШЕЙ ПРИ ВНУТРИКОЖНОМ ВВЕДЕНИИ РЕКОМБИНАНТНОГО ИЛ-36 γ ЧЕЛОВЕКА

© 2019 г. А. А. Колобов*, Т. А. Сазонова, Г. В. Александров, А. В. Петров

*E-mail: al.a.kolobov@hpb.spb.ru

ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» Федерального медико-биологического агентства, Санкт-Петербург, Россия

Поступила: 14.03.2019. Принята: 28.03.2019

Разработана и охарактеризована модель псориазоподобного поражения кожи у мышей при внутрикожном введении рекомбинантного ИЛ-36 γ человека. Вызываемое таким образом поражение кожи мышей по совокупности макроскопических (индекс PASI) и микроскопических (акантоз, паракератоз, инфильтрация дермы лейкоцитами) признаков обладает высоким сходством с псориазическим поражением кожи человека. Модель может быть использована для изучения эффективности препаратов для терапии псориаза.

Ключевые слова: псориаз, модель, цитокин, интерлейкин-36 гамма, ИЛ-36 γ

DOI: 10.31857/S102872210006690-4

Адрес: 197110 Санкт-Петербург, ул. Пудожская, д. 7 ФГУП «Гос.НИИ ОЧБ» ФМБА России, Колобов Алексей Александрович. Тел.: +7 (812) 499-17-00.

E-mail: al.a.kolobov@hpb.spb.ru

Авторы:

Колобов А. А., к.б.н., м.н.с. лаборатории иммунофармакологии ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия;

Сазонова Т. А., младший биолог отдела доклинических исследований ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия;

Александров Г. В., к.б.н., зам. начальника отдела доклинических исследований ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия;

Петров А. В., к.м.н., начальник лаборатории иммунофармакологии ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия.

ВВЕДЕНИЕ

Семейство интерлейкинов-36 (ИЛ-36) играет ключевую роль в регуляции воспаления в коже. Оно состоит из трёх провоспалительных (ИЛ-36 α , β , γ) и одного противовоспалительного цито-

кина (ИЛ-36РА). Известно, что снижение продукции ИЛ-36РА или повышение продукции ИЛ-36 γ приводит к развитию псориаза. Внутрикожное введение интерлейкина-36 γ (ИЛ-36 γ) может быть подходом к моделированию псориазоподобного дерматита на мышах. Причём не исключено, что такая модель биохимически будет более похожа на псориаз человека, чем, например, широко применяемая имихимодная модель.

Цель. Разработать и охарактеризовать модель псориазоподобного поражения кожи у мышей при внутрикожном введении рекомбинантного ИЛ-36 γ человека.

МЕТОДЫ

Рекомбинантный ИЛ-36 γ человека был получен от штамма-продуцента на основе *E. coli* BL21Star и очищен хроматографически.

В экспериментах по разработке модели псориазоподобного дерматита рекомбинантный ИЛ-36 γ человека вводили мышам интрадермально, в кожу спины, в дозах 5,1 и 0,2 мкг/мышь в сутки ежедневно в течение 5 дней. В экспе-

рименте по оценке воздействия препаратов рекомбинантного ИЛ-36РА и метотрексата на выраженность псориазоподобного поражения кожи мышей ИЛ-36γ вводили в дозе 5 мкг/мышь в сутки ежедневно в течение 7 дней.

Животным контрольных групп по тем же схемам интрадермально вводили физиологический раствор. Ежедневно проводили морфометрическое исследование толщины кожной складки и визуальную оценку поражения кожи в месте введения препарата. Гистологическое исследование проводили на 2-й, 5-й и 7-й дни эксперимента.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Внутрикожное введение рекомбинантного ИЛ-36 γ человека оказало видимый эффект уже в первый день эксперимента – в месте инъекции появились эритема и шелушение. Расчёт индекса PASI (psoriasis area and severity index) показал, что в группе, получавшей ИЛ-36γ в максимальной дозе 5 мкг, изменения были достоверны уже на первый день в сравнении с соответствующим значением контрольной группы. Начиная со 2-го дня и до конца эксперимента, индекс PASI во всех опытных группах был достоверно выше по сравнению с таковым в контрольной группе.

В группе, получавшей рекомбинантный ИЛ-36γ человека в дозе 5 мкг, индекс толщины кожной складки был достоверно выше, чем соответствующий показатель в контрольной группе, начиная со 2-го дня и до конца эксперимента. В группе, получавшей ИЛ-36 в дозе 1 мкг, этот показатель был достоверно выше по сравнению с контролем, начиная с 4-го дня эксперимента.

Гистологическое исследование микропрепаратов кожи, проведённое на 2-й, 5-й и 7-й дни эксперимента, показало, что на всех сроках в опытной группе, получавшей ИЛ-36γ человека в дозе 5 мкг/мышь, наблюдаются основные морфологические изменения, характерные для

псориазоподобного дерматита. На 2-й день эксперимента наблюдалось утолщение эпидермиса и слабовыраженная инфильтрация дермы лейкоцитами. На 5-й день морфологические изменения были более выражены: на микропрепаратах наблюдается выраженный акантоз и лейкоцитарная инфильтрация. На 7-й день у животных опытной группы, помимо усиливающегося акантоза и лейкоцитарной инфильтрации, наблюдается выраженный паракератоз.

Выраженность псориазоподобного поражения кожи снижалась в ответ на терапевтическое воздействие обоими испытанными препаратами – метотрексатом и ИЛ-36РА. Терапевтическое действие рекомбинантного ИЛ-36РА не уступает по эффективности действию метотрексата.

ОБСУЖДЕНИЕ

Макроскопические и микроскопические признаки полученного поражения кожи мышей сходны с признаками псориаза человека. Гистологическое исследование выявило взаимосвязь макроскопических и микроскопических признаков данного дерматита, что позволяет в дальнейшем не прибегать к гистологическому исследованию, а делать вывод о тяжести поражения на основании только макроскопических методов оценки. Эффективная доза рекомбинантного ИЛ-36γ человека при внутрикожном введении мыши составляет от 1 до 5 мкг/животное.

ВЫВОДЫ

Модель псориазоподобного поражения кожи мышей при внутрикожном введении рекомбинантного ИЛ-36γ человека по совокупности макроскопических и микроскопических признаков обладает высоким сходством с псориазическим поражением кожи человека. Она может быть использована для изучения эффективности препаратов для терапии псориаза.

**THE MODEL OF PSORIASIFORM DERMATITIS IN MICE
INDUCED BY INTRADERMAL ADMINISTRATION OF RECOMBINANT
HUMAN IL-36 γ**

© 2019 **A. A. Kolobov***, **T. A. Sazonova**, **G. V. Alexandrov**,
A. V. Petrov

**E-mail: al.a.kolobov@hpb.spb.ru*

State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Saint-Petersburg, Russia

Received: 14.03.2019. **Accepted:** 28.03.2019

We developed and characterized the model of psoriasiform dermatitis in mice induced by induced by intradermal administration of recombinant human IL-36 γ . Induced skin lesions resemble human psoriasis in means of both macroscopic (PASI) and microscopic features (acanthosis, parakeratosis, dermal leucocyte infiltration). This model can be used for anti-psoriatic drugs efficiency research.

Key words: psoriasis, model, cytokine, interleukin-36 gamma, IL-36 γ

Authors:

Kolobov A. A., ✉ PhD, Junior Scientist of Laboratory of Immunopharmacology, State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Saint-Petersburg, Russia. **E-mail:** al.a.kolobov@hpb.spb.ru;

Sazonova T. A., Junior Biologist of Department of Preclinical Studies, State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Saint-Petersburg, Russia;

Alexandrov G. V., PhD, Deputy Head of Department of Preclinical Studies, State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Saint-Petersburg, Russia;

Petrov A. V., PhD, Head of Laboratory of Immunopharmacology, State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Saint-Petersburg, Russia.

ИММУННЫЕ НАРУШЕНИЯ ПРИ ВНЕБОЛЬНИЧНОЙ ПНЕВМОНИИ

© 2019 г. Е. Н. Конопля, Д. В. Поляков*, С. А. Лосенок

*E-mail: dima-polaykov@mail.ru

ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет»
Минздрава РФ, Курск, Россия

Поступила: 20.02.2019. Принята: 04.03.2019

Внебольничная пневмония остается одним из самых распространенных инфекционных заболеваний. Изменяющаяся эпидемиологическая обстановка заставляет пересматривать существующие подходы к ее лечению. Изучены иммунные и метаболические нарушения до и после стандартной терапии у больных внебольничной пневмонией. У включенных в исследование пациентов выявлены лабораторные критерии, указывающие на наличие иммунного воспаления, оксидантного стресса, эндотелиальной дисфункции и активации перекисного окисления липидов. Проведенное стандартное лечение не нормализует большинство измененных параметров иммунного и метаболического статуса, что обуславливает необходимость поиска методов коррекции данных нарушений.

Ключевые слова: внебольничная пневмония, иммунное воспаление, оксидантный стресс, эндотелиальная дисфункция, перекисное окисление липидов

DOI: 10.31857/S102872210006688-1

Адрес: 305041, Курск, ул. Карла Маркса, д.3, ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, Конопля Евгения Никитична.
Тел.: 8 910 730 19 16 (моб.).

E-mail: dima-polaykov@mail.ru

Авторы:

Конопля Е. Н., д.м.н., заведующая кафедрой пропедевтики внутренних болезней ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, Курск, Россия;

Поляков Д. В., к.м.н., доцент кафедры пропедевтики внутренних болезней ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, Курск, Россия;

Лосенок С. А., д.м.н., доцент кафедры общей гигиены ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, Курск, Россия.

Болезни органов дыхания стабильно занимают лидирующее место в структуре общей заболеваемости населения Российской Федерации, составив в 2014 году 29 455 225 случаев (54,2% всех заболеваний) у детей, 3 403 (33,2%) — у подростков, 23 394 842 (13,6%) — у взрослых [1]. В России официальная статистика учитывает 400 тысяч больных внебольничной пневмонией (ВП) в год, хотя реальное число больных значительно выше (около 1,5 млн. человек).

В патогенезе ВП ведущую роль играют массивная и вирулентная инфекция, снижение неспецифической резистентности организма, дисбаланс локального и системного иммунитета, нарушение процессов свободно-радикального окисления. Известно, что в развитии и разрешении практически всех патологических состояний, тем более имеющих инфекционную этиологию, большую роль играют иммунные механизмы, при этом хорошо описана взаимосвязь изменений метаболических и иммунологических. Тем не менее, комплексных исследований, посвященных изучению иммунного и метаболического статуса не только до, но и после стандартного лечения достаточно мало [2, 3].

Цель исследования: установление иммунных и метаболических нарушений до и после стандартного лечения у пациентов с ВП.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование было включено 46 больных (от 20 до 77 лет) внебольничной бактериальной пневмонией, впервые проходивших комплексное стандартное лечение в условиях

профильного отделения. Продолжительность заболевания на амбулаторном этапе составила $8,1 \pm 1,09$ дней. Включенные в исследование больные в 73,2% случаев имели сопутствующую патологию, а в 23,2% случаев отмечены заболевания верхних дыхательных путей. Критерии включения пациентов в исследование: возраст пациентов не моложе 18 лет, диагноз ВП, установленный на основании характерных для этого заболевания эпидемиологических, клинкорентгенологических и лабораторных данных. Контрольную группу составили 18 практически здоровых лиц ($38,2 \pm 4,5$ года), сопоставимые с больными по полу и возрасту.

Содержание цитокинов, компонентов комплемента и их ингибиторов определяли в плазме крови. Регистрация всех результатов ИФА осуществлялась при помощи микропланшетного фотометра «Sunrise», Tecan (Австрия).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В плазме крови больных ВП до начала лечения установлено повышение провоспалительных цитокинов: TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-17 и IL-18 соответственно в 4,8; 2,2; 2,9; 4,0; 1,5 и 2,3 раза, снижение противовоспалительных цитокинов: IL-4, IL-10 и IL-1RA соответственно в 1,8; 2,4 и 2,3 раза. Содержание IFN γ , IL-2 и ростового фактора G-CSF оказалось выше параметров здоровых доноров соответственно в 2,1; 25,7 и 7,0 раза. После проведенного лечения концентрации IL-4 и IL-10 нормализовались, уровень IL-17 и IFN γ не изменялся, а содержание остальных исследованных цитокинов корригировалось в сторону значения здоровых доноров, но не до их значений.

На момент поступления в клинику у пациентов с ВП из других параметров иммунного статуса выявлено снижение содержания C3, C3a, C4, C5-компонентов комплемента и C1-ингибитора соответственно в 33,3; 2,3; 44,8; 12,0 и 1,9 раза, повышение C5a и IgA в 1,9 раз, уровень ингибитора фактора H остался в пределах нормы. После проведенного стандартного лечения концентрации C1-ингибитора нормализовалось, содержание C3a, C4, C5a и IgA корригировалось в сторону значения здоровых доноров, уровень C3, C5-компонентов комплемента и фактора H не изменялись, но снижались ниже показателей доноров концентрация IgM и Ig G.

На начало лечения результаты исследования функционально-метаболической активности нейтрофилов периферической крови получены

следующие результаты: снижение по сравнению со здоровыми донорами показателей активности и интенсивности фагоцитоза (ФИ, ФЧ и ИАФ), увеличение параметров активности кислород-зависимых систем полиморфно-ядерных лейкоцитов (НСТ-сп., НСТ-ст.), при отсутствии изменений ФРН и снижением ИСН. После лечения нормализовалось большинство исследованных параметров функционально-метаболической активности нейтрофилов за исключением корригированного НСТ-сп. теста.

Таким образом, из 45 исследованных параметров иммунного и метаболического статуса у пациентов с ВП на момент поступления в клинику оказались измененными от значений здоровых доноров 41 (91,1%) показатель. Можно сделать вывод о глубоких иммунометаболических нарушениях, которые можно рассматривать как иммунное воспаление, оксидантный стресс, эндотелиальная дисфункция и активация перекисного окисления липидов. Важно отметить, что проведенный курс стандартного лечения, включавший 10 дней, не нормализовал 70,7% измененных до лечения исследованных лабораторных иммунометаболических параметров и дополнительно снизил ниже значений доноров содержание IgM и IgG у когорты больных ВП, что требует применения сочетанной иммуномодулирующей и антиоксидантной терапии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Биличенко Т. Н., Быстрицкая Е. В., Чучалин А. Г., Белевский А. С., Батын С. З. Смертность от болезней органов дыхания в 2014–2015 гг. и пути ее снижения // Пульмонология. – 2016. – Т. 26, № 4. – С. 389–397. – DOI: 10.18093/0869-0189-2016-26-4-389-397. [Bilichenko T. N., Bystritskaya E. V., Chuchalin A. G., Belevskiy A. S., Batyn S. Z. Mortality of respiratory disease in 2014–2015 and ways of its improvement. Pul'monologiya. 2016; 26(4): 389–397].
2. Гаврилюк Е. В., Конопля А. И., Караулов А. В. Роль иммунных нарушений в патогенезе артериальной гипертонии // Иммунология. – 2016. – Т. 37, № 1. – С. 29–34. – DOI: 10.18821/0206-4952-2016-37-1-29-35. [Gavriliuk E. V., Konoplya A. I., Karaulov A. V. Role of immune disturbances in the pathogenesis of the arterial hypertension. Immunologiya. 2016; 37(1): 29–34].
3. Локтионов А. Л., Конопля А. И., Евсегнеева И. В. Острый панкреатит как клинко-иммунологическая проблема (обзор литературы) // Физиология и патология иммунной системы. Иммунофармакогенетика. – 2013. – Т. 17, № 11. – С. 3–17. [Loktionov A. L., Konoplya A. I., Evsegneyeva I. V. Acute pancreatitis as a clinical and immunological problem (literature review). Fiziologiya i patologiya immunnoy sistemy. Immunofarmakogenetika. 2013; 17(11): 3–17].

IMMUNE DISORDERS IN PATIENTS WITH COMMUNITY-ACQUIRED PNEUMONIA

© 2019 E. N. Konoplya, D. V. Polyakov*, S. A. Losenok

*E-mail: dima-polaykov@mail.ru

Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Kursk State Medical University» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Kursk, Russia

Received: 20.02.2019. **Accepted:** 04.03.2019

Community-acquired pneumonia remains one of the most common infectious diseases. Changing epidemiological situation makes it necessary to revise the existing approaches to its treatment. Immune and metabolic disorders are studied before and after standard medical therapy in patients with community-acquired pneumonia. The patients included in the research had laboratory criteria which indicated presence of immune inflammation, oxidative stress, endothelial dysfunction and activation of lipid peroxidation. The performed standard treatment does not regulate the majority of modified parameters of immune and metabolic status, what stipulates the necessity of search for the methods of correction of disorders.

Key words: community-acquired pneumonia, immune inflammation, oxidative stress, endothelial dysfunction, lipid peroxidation

Authors:

Konoplya E. N., ✉ MD, Head of the Department of Propaedeutics of Internal Diseases of Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Kursk State Medical University» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Kursk, Russia. **E-mail:** dima-polaykov@mail.ru;

Polyakov D. V., PhD, associate professor of the department of Propaedeutics of Internal Diseases of Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Kursk State Medical University» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Kursk, Russia;

Losenok S. A., MD, associate professor of the department of General Hygiene of Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Kursk State Medical University» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Kursk, Russia.

СИНТЕЗ И ПРОДУКЦИЯ TH2 ЦИТОКИНОВ НА СИСТЕМНОМ И ЛОКАЛЬНОМ УРОВНЕ У ПАЦИЕНТОК С БЕСПЛОДИЕМ И ЭНДОМЕТРИОЗОМ

© 2019 г. А. К. Красильникова, А. И. Малышкина, Н. Ю. Сотникова,
Ю. С. Анциферова

E-mail: niimid.immune@mail.ru

*ФГБУ «Ивановский НИИ материнства и детства имени В. Н. Городкова»
Минздрава России, Иваново, Россия*

Поступила: 26.02.2019. Принята: 12.03.2019

Установлено, что независимо от степени тяжести заболевания на системном уровне повышен синтез IL-4, внутриклеточная экспрессия IL-4 и IL-6 в общей популяции лимфоцитов и в популяции Т-хелперов, а в перитонеальной жидкости увеличен уровень IL-6⁺ лимфоцитов. Изменения синтеза, внутриклеточной экспрессии и сывороточного содержания IL-4 были пропорциональны степени тяжести эндометриоза. При эндометриозе I–II стадий повышалась внутриклеточная продукция IL-5 в общей популяции лимфоцитов и в пуле Т-хелперов, с эндометриозом III–IV стадий увеличивался синтез IL-6 периферическими лимфоцитами, сывороточный уровень IL-4, а также IL-4⁺ и CD4⁺IL-4⁺ лимфоцитов и sCD30 в перитонеальной жидкости.

Ключевые слова: эндометриоз, Т-хелперы 2 типа, цитокины, периферическая кровь, перитонеальная жидкость, бесплодие

DOI: 10.31857/S102872210006689-2

Адрес: 153045 Иваново, ул. Победы, д. 20, ФГБУ «Ивановский научно-исследовательский институт материнства и детства им. В. Н. Городкова» Минздрава РФ, отдел акушерства и гинекологии, Красильникова Ангелина Ксенофонтовна. Тел./факс: +8 920 345 68 09 (моб.).

E-mail: brasilia71@mail.ru

Авторы:

Красильникова А. К., к.м.н., ст.н.с. отдела акушерства и гинекологии ФГБУ «ИВ НИИ Мид им. В. Н. Городкова» Минздрава России, Иваново, Россия;

Малышкина А. И., д.м.н., профессор, директор ФГБУ «ИВ НИИ Мид им. В. Н. Городкова» Минздрава России, Иваново, Россия;

Сотникова Н. Ю., д.м.н., проф. зав. лабораторией клинической иммунологии ФГБУ «ИВ НИИ Мид им. В. Н. Городкова» Минздрава России, Иваново, Россия;

Анциферова Ю. С., д.б.н., в.н.с. лаборатории клинической иммунологии ФГБУ «ИВ НИИ Мид им. В. Н. Городкова» Минздрава России, Иваново, Россия.

Эндометриоз является широко распространенным и одним из самых загадочных гинекологических заболеваний. Несмотря на это единой теории патогенеза эндометриоза все еще не существует. Наиболее важную роль отводят иммунным механизмам развития эндометриоза и связанного с ним бесплодия. Доказано, что

у пациенток с эндометриозом наряду с изменениями в функционировании клеток врожденного иммунитета [1] отмечаются аутоиммунные нарушения, определяющие повышенную выработку аутоантител различной природы [2]. Нами была проведена оценка показателей, характеризующих активность гуморального звена иммунитета, а именно особенностей синтеза и продукции цитокинов IL-4, IL-5 и IL-6 лимфоцитами крови и перитонеальной жидкости, непосредственно участвующих в активации В-лимфоцитов, которые являются активными продуцентами аутоантител.

Исследование проводилось на базе эндоскопического отделения ФГБУ «Ивановский НИИ материнства и детства им. В. Н. Городкова» Минздрава России. Было обследовано 453 женщины, из них 103 здоровые фертильные женщины с реализованной репродуктивной функцией (контрольная группа), 264 женщины с I–II стадиями эндометриоза или «малыми» формами и бесплодием и 86 женщин с III–IV стадиями эндометриоза или распространенными формами и бесплодием по классификации ASF. Ве-

нозную кровь и перитонеальную жидкость забирали до проведения оперативного лечения. Экспрессию мРНК IL-4, IL-5 и IL-6 периферическими и перитонеальными лимфоцитами определяли методом РТ ПЦР в реальном времени, относительное содержание CD4⁺IL-4⁺ и CD4⁺IL-5⁺ и CD4⁺IL-6⁺ – методом проточной цитометрии в лимфоцитарном гейте, концентрацию IL-4, IL-6 и уровень sCD3 в сыворотке крови и перитонеальной жидкости – методом ИФА. Популяцию периферических лимфоцитов получали, используя негативную магнитную сепарацию. Статистический анализ данных осуществляли с оценкой достоверности различий между показателями с помощью t-критерия Стьюдента и критерия Манна-Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Возраст женщин соответствовал активному репродуктивному возрасту. У женщин с эндометриозом и бесплодием, достоверно чаще, чем в контроле, встречались аллергические реакции в анамнезе (в группе с эндометриозом I–II стадией – у 21,2%, $p=0,000$; в группе с эндометриозом III–IV стадии – 16,3%, $p=0,01$), заболевания желудочно-кишечного тракта (13,2% с I–II стадиями эндометриоза, $p=0,03$), что согласуется с данными литературы [3].

При эндометриозе и бесплодии независимо от степени тяжести на системном уровне была выше, чем в контроле, экспрессия лимфоцитами мРНК IL-4 ($p=0,015$ при I–II стадии эндометриоза, $p=0,002$ при III–IV стадии) и мРНК IL-6 ($p<0,05$). Достоверных изменений в синтезе IL-4 и IL-6 перитонеальными лимфоцитами выявлено не было.

У женщин с эндометриозом и бесплодием в крови было повышено содержание IL-4⁺ лимфоцитов, CD4⁺IL-4⁺, IL-6⁺, CD4⁺IL-6⁺ ($p=0,000$ во всех случаях), а в перитонеальной жидкости – только уровня IL-6⁺ лимфоцитов ($p=0,027$ при I–II стадии эндометриоза, $p=0,001$ при III–IV стадии).

Ряд показателей коррелировал со стадией эндометриоза. Так, изменения синтеза, внутриклеточной экспрессии и сывороточного содержания IL-4 были пропорциональны степени тяжести эндометриоза и максимально проявлялись при эндометриозе III–IV стадий. Для пациенток с распространенным эндометриозом было характерно достоверное повышение экспрессии мРНК IL-4 и IL-6 периферическими лимфоцитами ($p=0,003$, $p<0,05$ соответственно),

увеличение сывороточной концентрации IL-4 ($p=0,038$), а также повышение относительно содержания IL-4⁺ лимфоцитов и CD4⁺IL-4⁺ клеток ($p=0,038$ в обоих случаях) по сравнению с аналогичными показателями группы с «малыми» формами эндометриоза. Также было повышено содержание молекул, регулирующих активность гуморальных иммунных реакций, в частности уровня растворимой формы sCD30 в перитонеальной жидкости по сравнению с контролем ($p=0,014$).

Отличительной чертой женщин с эндометриозом I–II стадий, по нашим данным, было повышение внутриклеточной продукции IL-5 в общей популяции периферических лимфоцитов и Т-хелперов по сравнению с показателями здоровых фертильных женщин ($p=0,000$ и $p=0,018$ соответственно).

ОБСУЖДЕНИЕ

Таким образом, при эндометриозе на системном и локальном уровне по нашим данным была усилена активность Т-хелперов 2 типа за счет повышенного синтеза и продукции цитокинов 2-го типа IL-4, IL-5, IL-6 и растворимой формы CD30, которые играют важную роль в регуляции иммунных механизмов развития эндометриоза и связанного с ним бесплодия, что полностью согласуется с литературными данными [4]. Максимальная степень их изменения при III–IV стадиях эндометриоза может косвенно свидетельствовать о значимости активности Th2-зависимых иммунных реакций в патогенезе эндометриоза. А установленное достоверное усиление внутриклеточной экспрессии CD4⁺ лимфоцитами IL-5 при «малых» формах эндометриоза может оказывать влияние на развитие у них бесплодия за счет индукции процессов антителогенеза и выработки аутоантител В1 клетками несмотря на минимальные анатомические изменения брюшины.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Красильникова А. К., Малышкина А. И., Сотникова Н. Ю., Анциферова Ю. С. Особенности функционального состояния фагоцитов крови у пациенток с эндометриозом I–II стадии и бесплодием. [Krasilnikova A. K., Makyshkina A. I., Sotnikova N. Yu., Antziferova Yu. S. The functional state of peripheral phagocytes in patients with endometriosis of I–II stage and infertility. // Russian Bulletin of the obstetrician-gynecologist. 2017. Vol. 17. № 3. p. 9–14.]
2. Красильникова А. К., Абдуллаева Л. Х., Малышкина А. И., Сотникова Н. Ю., Анциферова Ю. С. Осо-

- бенности регуляции гуморального иммунного ответа на системном и локальном уровнях при эндометриозе. Таврический медико-биологический вестник. 2017. Т. 20. № 2–2. С. 58–62. [Krasilnikova A. K., Abdulaeva L. H., Makyshkina A. I., Sotnikova N. Yu., Antziferova Yu. S. The features of regulation of humoral immune response at systemic and local level during endometriosis. Tauride Medical-Biological Herald. 2017. Vol. 20. № 2–2. P. 58–62.]
3. Jess T., Frisch M., Jørgensen K. T., Pedersen B. V., Nielsen N. M. Increased risk of inflammatory bowel disease in women with endometriosis: a nationwide Danish cohort study. *Gut* 2012;61(9):1279–83.
 4. Szylo K., Tchorzewski H., Banasik M., Glowacka E., Lewkowicz P., KamerBartosinska A. The involvement of T lymphocytes in the pathogenesis of endometriotic tissues overgrowth in women with endometriosis. *Mediators Inflamm.*— 2003.— Vol. 12, № 3.— P. 131–138.

Th2 TYPE CYTOKINES SYNTHESIS AND PRODUCTION AT SYSTEMIC AND LOCAL LEVEL IN PATIENTS WITH INFERTILITY AND ENDOMETRIOSIS

© 2019 A. K. Krasilnikova, A. I. Makyshkina, N. Yu. Sotnikova, Yu. S. Antziferova

E-mail: niimid.immune@mail.ru

Federal State Budget Establishment «Ivanovo research institute of maternity and childhood by V. N. Gorodkov» of Ministry of Health of Russia, Ivanovo, Russia

Received: 26.02.2019. **Accepted:** 12.03.2019

It has been established that during endometriosis, regardless of the severity of the disease, at the systemic level IL-4 synthesis, intracellular expression of IL-4 and IL-6 were increased in the total lymphocyte and in the T-helper population, and in the peritoneal fluid the level of IL-6⁺ lymphocytes was increased. Changes in the synthesis, intracellular expression and the serum IL-4 content were proportional to the severity of endometriosis. In endometriosis stages I–II the intracellular production of IL-5 increased in the total lymphocyte population and in the T-helper pool. In endometriosis III–IV the IL-6 synthesis by peripheral lymphocytes increased, as well as the serum level of IL-4, the amount of IL-4⁺, CD4⁺IL-4⁺ lymphocytes and sCD30 in the peritoneal fluid.

Key words: endometriosis, T-helpers type 2, cytokines, peripheral blood, peritoneal fluid, infertility

Авторы:

Krasilnikova A. K., ✉ Candidate of Medical Sciences, Senior Researcher of the Department of Obstetrics and Gynecology Federal State Budget Establishment «Ivanovo research institute of maternity and childhood by V. N. Gorodkov» of Ministry of Health of Russia, Ivanovo, Russia. **E-mail:** brasilia71@mail.ru;

Makyshkina A. I., Doctor of Medical sciences, professor, the director of Federal State Budget Establishment «Ivanovo research institute of maternity and childhood by V. N. Gorodkov» of Ministry of Health of Russia, Ivanovo, Russia;

Sotnikova N. Yu., Doctor of Medical sciences., professor, head of the laboratory of clinical immunology of Federal State Budget Establishment «Ivanovo research institute of maternity and childhood by V. N. Gorodkov» of Ministry of Health of Russia, Ivanovo, Russia;

Antziferova Yu. S., Doctor of Biological Sciences, the leading scientific researcher of the laboratory of clinical immunology of Federal State Budget Establishment «Ivanovo research institute of maternity and childhood by V. N. Gorodkov» of Ministry of Health of Russia, Ivanovo, Russia.

ВЫЯВЛЯЕМОСТЬ АНТИНУКЛЕАРНОГО ФАКТОРА У ЗДОРОВЫХ ДЕТЕЙ И ВЗРОСЛЫХ

© 2019 г. И. М. Криволапова^{1,2*}, И. А. Пашнина^{1,2}, В. А. Черешнев²

*E-mail: krivolapovaim@mis66.ru

¹Клинико-диагностическая лаборатория, Областная детская
клиническая больница, Екатеринбург, Россия;

²Лаборатория иммунологии воспаления, Институт иммунологии
и физиологии УрО РАН, Екатеринбург, Россия

Поступила: 14.03.2019. Принята: 25.03.2019

У 100 здоровых доноров в возрасте от 21 до 59 лет и у 55 условно здоровых детей в возрасте от 2 до 17 лет определяли антинуклеарный фактор в реакции непрямой иммунофлюоресценции. Выявлено, что 7 взрослых (7%) и 10 детей (18%) имели диагностически значимые титры при определении антинуклеарного фактора. Основными типами свечения субстрата были гомогенный и гранулярный.

Ключевые слова: антинуклеарный фактор, здоровые, дети, взрослые

DOI: 10.31857/S102872210006687-0

Адрес: 620149, Екатеринбург, ул. С. Дерябиной, 32, ГАУЗ СО «Областная детская клиническая больница», Криволапова Ирина Михайловна. Тел.: 8 (343) 231-91-28.

E-mail: krivolapovaim@mis66.ru

Авторы:

Криволапова И. М., биолог клинико-диагностической лаборатории ГАУЗ СО «Областная детская клиническая больница», Екатеринбург, Россия; младший научный сотрудник лаборатории иммунологии воспаления ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, Екатеринбург, Россия;

Пашнина И. А., д.б.н., заведующая клинико-диагностической лабораторией ГАУЗ СО «Областная детская клиническая больница», Екатеринбург, Россия; старший научный сотрудник лаборатории иммунологии воспаления ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, Екатеринбург, Россия;

Черешнев В. А., д.м.н., профессор, академик РАН, главный научный сотрудник ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, Екатеринбург, Россия.

Антинуклеарные антитела (АНА) являются серологическими маркерами различных заболеваний соединительной ткани. Определение антинуклеарного фактора (АНФ) в реакции непрямой иммунофлюоресценции является наиболее распространенным методом для диагностики системных аутоиммунных заболеваний. При этом имеются свидетельства, что антинуклеарные антитела обнаруживаются в когорте

здоровых субъектов. По данным зарубежной литературы, распространенность АНА у здоровых людей значительно варьирует и может зависеть от региона и местности (городской, сельской) проживания, профессии, национальной принадлежности и т.д. [1, 2]. В доступных литературных источниках, практически отсутствуют данные о частоте встречаемости антинуклеарных антител у здоровых детей и взрослых, проживающих на территории Российской Федерации.

Целью нашей работы явилось исследование частоты встречаемости антинуклеарного фактора у здоровых детей и взрослых.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Обследовано 100 взрослых доноров в возрасте от 21 до 59 лет и 55 условно здоровых детей и подростков в возрасте от 2 до 17 лет. На момент обследования у детей и взрослых отсутствовали признаки аутоиммунных, аллергических и инфекционных заболеваний. Определяли антинуклеарный фактор в реакции непрямой иммунофлюоресценции с использованием в качестве субстрата клеток линии Нер-20–10 (Euroimmun, Германия). Диагностическим считали титр АНФ 1/320 и более.

Выявлено, что семь здоровых взрослых (7%) имели положительные результаты АНФ, у всех титр АНФ был 1/320. Частота встречаемости АНФ в группе условно здоровых детей была выше, десять человек (18%) имели титры АНФ выше нормальных значений, у 9 детей наблюдался титр 1/320, у одного ребенка – 1/640. Таким образом, в группе условно здоровых детей антинуклеарный фактор выявлялся в 2,3 раза чаще, чем у взрослых людей. В статье [1], сообщается о том, что распространенность АНФ у разных категорий здоровых взрослых (доноры, работники медицинских учреждений, здоровые добровольцы, жители небольших городов), варьировала в широких пределах от 1,1% до 20%. Среди здоровых детей, выявляемость АНФ также различается и составляет, по данным разных авторов, от 3% [3] до 15% [4].

В работе F. Cacciapaglia с соавт. [2] выявлено, что положительные результаты АНФ обнаружались у 23,7% здоровых филиппинцев, мигрировавших в Италию, по сравнению с жителями Италии, у которых частота встречаемости АНФ составила 8,3%. По мнению авторов, высокая частота встречаемости АНФ у мигрантов может быть обусловлена, в том числе, воздействием окружающей среды, в которой они проживали длительное время до переезда. Имеются свидетельства, что у жителей сельской местности более высокая частота встречаемости АНА, чем у городского населения, предполагается, что данный феномен может быть обусловлен воздействием токсических веществ, используемых в сельском хозяйстве. Нами ранее выявлено, что у детей с аллергическими заболеваниями, без признаков наличия аутоиммунных процессов, проживающих на экологически неблагоприятных территориях, частота положительных титров АНФ достигала 30% [5]. С другой стороны, наличие аутоантител может быть обусловлено присутствием различных инфекционных агентов в организме и может носить кратковременный характер, однако на момент исследования ни один из обследованных нами здоровых субъектов не имел признаков инфекционных заболеваний.

Анализ флюоресценции субстрата показал, что у четырех детей с положительными результатами АНФ выявлялся гомогенный тип свечения ядра и у четырех человек – гранулярный; нуклеолярный и недифференцированный типы флюоресценции имели по одному ребенку. У шести

взрослых доноров присутствовал гомогенный тип свечения субстрата и у одного – гранулярный. Таким образом, самыми распространенными типами свечения были гомогенный и гранулярный, у детей – 43% и 29%, соответственно; у взрослых – 86% и 14%, соответственно. В исследованиях S. Wananukul и соавт. выявлено, что в группе здоровых детей также преобладали гомогенный и гранулярный типы флюоресценции субстрата (47% и 20%, соответственно) [3].

Таким образом, частота встречаемости антинуклеарного фактора у здоровых взрослых составила 7%, а в группе условно здоровых детей – 18%, с преобладанием гомогенного и гранулярного типов свечения субстрата. Наличие позитивных результатов АНФ у здоровых субъектов указывает на необходимость дальнейших исследований, направленных на уточнение границ нормальных значений и их зависимости от региона проживания обследованных, их расовой/национальной принадлежности, экологического фона и других факторов среды.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Saton M., Chan E. K. L., Ho L. A., Rose K. M., Parks Ch. G., Cohn R. D., Jusko T. A., Walker N. J., Germolec D. R., Whitt I. Z., Crockett P. W., Pauley B. A., Chan J. Y. F., Ross S. J., Birnbaum L. S., Zeldin D. C., Miller F. W. Prevalence and Sociodemographic Correlates of Antinuclear Antibodies In the United States. *Arthritis Rheum.* 2012, 64; 7, 2319–2327.
2. Cacciapaglia F., Arcarese L., Rigon A., Vadacca M., Valorani M. G., Pozzilli P., Afeltra A. Antinuclear antibodies prevalence in Filipinos migrated to Italy. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 2008, 12; 4, 267–270.
3. Wananukul S., Voramethkul W., Kaewopas Y., Orrawadee H. Prevalence of positive antinuclear antibodies in healthy children. *Asian pacific journal of allergy and immunology.* 2005, 23, 153–157.
4. Allen R. C., Dewez P., Stuart L. Gatenby P. A., Sturgess A. Antinuclear antibodies using HEp-2 cells in normal children and in children with common infections. *J. Paediatr. Child. Health.* 1991, 27; 1, 39–42.
5. Пашина, И.А., Плотникова И.А., Криволапова И.М., Цегельная В.П., Тузанкина И.А., Каракина М.Л., Семешева И.А. Признаки иммунопатологических процессов у детей, проживающих на территории с высокой техногенной нагрузкой. *Известия Самарского научного центра Российской академии наук.* 2013, 15; 3(6), 1904–1907. [Pashina I. A., Plotnikova I. A., Krivolapova I. M., Tsegelnaya V. P., Tuzankina I. A., Karakina M. L., Semisheva I. A. Signs of immunopathological processes at children, living in the territory with technogenic loading. *News of the Samara Scientific Center of the Russian Academy of Sciences.* 2013, 15; 3(6), 1904–1907].

PREVALENCE OF ANTINUCLEAR ANTIBODIES IN HEALTHY CHILDREN AND ADULTS

© 2019 I. M. Krivolapova^{1,2}, I. A. Pashnina^{1,2}, V. A. Chereshnev²

*E-mail: krivolapovaim@mis66.ru

¹Regional Child's Clinical Hospital № 1, Yekaterinburg, Russia;

²Institute of Immunology and Physiology Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, Russia

Received: 14.03.2019. Accepted: 25.03.2019

Healthy donors (n=100) of 21–59 years old and healthy children (n=55) of 2–17 years old were examined. Antinuclear antibodies were determined by indirect immunofluorescence assay. It was found that 7 adults (7%) and 10 children (18%) had diagnostic titers of antinuclear antibodies detected by indirect immunofluorescence assay. In healthy children and adults homogeneous and speckled fluorescence patterns were observed more often.

Key words: antinuclear antibody, healthy, children, adults

Authors:

Krivolapova I. M., ✉ Biologist, Clinical Diagnostic Laboratory, Regional Children's Clinical Hospital № 1, Yekaterinburg, Russia; Junior Research Associate, Laboratory of Immunology of Inflammation, Institute of Immunology and Physiology of the Ural Branch of the Russian Academy of Science, Yekaterinburg, Russia. **E-mail:** krivolapovaim@mis66.ru;

Pashnina I. A., PhD, Head of the laboratory, Clinical and diagnostic laboratory, Regional Children's Clinical Hospital № 1 Yekaterinburg, Russia; Senior Research Associate, Laboratory of Immunology of Inflammation, Institute of Immunology and Physiology of the Ural Branch of the Russian Academy of Science, Yekaterinburg, Russia;

Chereshnev V. A., PhD, Professor, Full Member, Russian Academy of Sciences, Main Research Associate, Institute of Immunology and Physiology of the Urals Branch of the Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, Russia.

ЦИТОКИНЫ В ПАТОГЕНЕЗЕ СПОНТАННОЙ КРАПИВНИЦЫ

© 2019 г. Е. А. Кривонкина^{1*}, С. М. Юдина², А. М. Бахирев³

*E-mail: Krivonkina@yandex.ru

¹ГБУЗ РК «Больница скорой медицинской помощи», Петрозаводск, Россия;

²ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, Курск, Россия;

³ФГБОУ ВО «Петрозаводский государственный университет», медицинский институт,
Петрозаводск, Россия

Поступила: 27.02.2019. Принята: 13.03.2019

Цитокины IL-4, и TNF α принимают участие в патогенезе спонтанной крапивницы и могут рассматриваться в дальнейшем как потенциальные биомаркеры заболевания.

Ключевые слова: крапивница, цитокины, сывороточный IgE

DOI: 10.31857/S102872210006686-9

Адрес: 185031 Россия, республика Карелия, Петрозаводск, ул. Кирова, д. 40, ГБУЗ РК «Больница скорой медицинской помощи», терапевтическое отделение № 1, Кривонкина Евгения Александровна.
Тел./факс: +7 (8142) 791177, 8921 5200793 моб.
E-mail: Krivonkina@yandex.ru

Авторы:

Кривонкина Е. А., врач аллерголог-иммунолог ГБУЗ РК «Больница скорой медицинской помощи», Петрозаводск, Россия;

Юдина С. М., д.м.н., профессор, зав. кафедрой клинической иммунологии, аллергологии и фтизиопульмонологии ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, Курск, Россия;

Бахирев А. М., к.м.н., доцент кафедры факультетской терапии, фтизиатрии, инфекционных болезней и эпидемиологии ФГБОУ ВО «Петрозаводский государственный университет», медицинский институт, Петрозаводск, Россия.

Крапивница представляет одну из наиболее значимых медико-социальных проблем, что обусловлено высокой распространенностью и существенным влиянием на качество жизни пациентов. Если клиническая диагностика крапивницы не вызывает затруднений, то вопросы патогенеза являются недостаточно изученными. Исследования последнего десятилетия демонстрируют разногласия ранее полученных знаний и влекут за собой изменения представлений о концепции патогенеза различных форм крапивницы. Так, рядом исследователей показано, что иммунная дисфункция и дисрегуляция с участием Th1, Th2, Th17 клеток и продуцируемых ими регу-

ляторных цитокинов лежит в основе патогенеза хронической спонтанной крапивницы [1, 2]. Показано также существенное функциональное значение IL-17, TNF α , IL-23, IL-1, IL-6, IL-31, IL-33, IL-4, IL-10, TNF γ , TGF β в патогенезе хронических форм крапивницы. Вместе с тем, приводимые данные об уровне этих цитокинов в сыворотке крови пациентов весьма противоречивы и дискуссионны [2, 3, 4].

С учетом этого целью работы являлось исследование цитокинового профиля пациентов со спонтанной крапивницей, задачей которого было выявление потенциальных биомаркеров крапивницы среди регуляторных цитокинов и определение их роли в патогенезе заболевания.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Под наблюдением было 48 пациентов со спонтанной крапивницей (средний возраст $41,8 \pm 13,2$ лет), госпитализированных в больницу скорой медицинской помощи г. Петрозаводска. Контрольную группу составили 18 здоровых доноров. Определение уровня IL-4, TNF α , сывороточного IgE проводилось методом ИФА с использованием тест-системы «Вектор-Бест». Статистическая обработка полученных данных проводилась с использованием компьютерной программы STATISTICA 6.0 (StatSoft, США). Для сравнения полученных данных использован

непараметрический метод – критерий знаковых рангов U-test Mann-Whitney (статистически значимый уровень при $p < 0,05$). Корреляционный анализ проведен с помощью ранговой корреляции Спирмена.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Проведенные исследования сывороточного IgE выявили неоднозначные результаты. Так, у 27,1% пациентов отмечено повышение уровня IgE в 9,9 раза по сравнению с контрольной группой ($M=220,75 \pm 135,1$ МЕ/мл и $M=22,19 \pm 46,08$ МЕ/мл, соответственно), у 22,9% – значительное увеличение в 85,4 раза ($M=1894,28 \pm 1171,73$ МЕ/мл), при этом у 50% пациентов IgE был сопоставим с показателем контрольной группы.

Исследование цитокинового профиля показало, что у пациентов с высоким содержанием сывороточного IgE наблюдалось и повышение IL-4 в 1,9 раза по сравнению с контрольной группой ($M=8,8 \pm 1,27$ пг/мл и $M=4,54 \pm 4,24$ пг/мл, соответственно), а также уровня TNF α в 1,9 раза ($M=4,02 \pm 3,66$ пг/мл и $M=2,09 \pm 3,2$ пг/мл). У пациентов со значительным превышением сывороточного IgE уровень IL-4 также был значительно повышен в 8,3 раза по сравнению с группой контроля ($M=37,76 \pm 55,89$ пг/мл), при этом уровень TNF α в этой группе был повышен только в 2,2 раза ($M=4,59 \pm 4,57$ пг/мл). В группе пациентов с нормальным уровнем сывороточного IgE содержание IL-4 превышало в 2,6 раза показатели контрольной группы ($M=11,91 \pm 4,77$ пг/мл), в то время как уровень TNF α – только в 1,2 раза ($M=2,57 \pm 4,08$).

Анализируя полученные данные, следует отметить достоверное повышение уровня IL-4 как у пациентов, имеющих высокий уровень сывороточного IgE ($p=0,001$, $p < 0,05$, Uэмп. Mann-Whitney=34,5) и значительно высокий ($p=0,000084$, $p < 0,05$, Uэмп. Mann-Whitney=11,0), так и у пациентов с нормальным уровнем IgE ($p=0,000015$, $p < 0,05$, Uэмп. Mann-Whitney=45,0). Также выявлено достоверное повышение концентрации TNF α у пациентов с высоким ($p=0,002$, $p < 0,05$, Uэмп. Mann-Whitney=39,5) и значительно высоким ($p=0,0043$, $p < 0,05$, Uэмп. Mann-Whitney=35,0) уровнем сывороточного IgE. У пациентов с нормальным уровнем IgE достоверного повышения концентрации TNF α

не выявлено ($p=0,1699$, $p > 0,05$, Uэмп. Mann-Whitney=161,5).

Проведенный корреляционный анализ показал, что высокий уровень TNF α достоверно коррелирует с повышенным уровнем сывороточного IgE ($R=0,44$, $p=0,0015$, $p < 0,05$). Несмотря на то, что содержание IL-4 в исследуемой группе значительно превышало его концентрацию в контрольной группе, проведенный анализ не выявил достоверной корреляционной связи между IL-4 и сывороточным IgE ($R=0,15$, $p=0,32$).

ВЫВОДЫ

1. Полученные результаты дают основание предположить, что наряду с участием ИЛ-4 в патогенезе спонтанной крапивницы, отсутствие достоверной корреляционной связи между IL-4 и сывороточным IgE может служить косвенным признаком того, что в патогенезе спонтанной крапивницы задействованы и не IgE-опосредованные механизмы.

2. Достоверная корреляционная связь между уровнем TNF α и сывороточным IgE гипотетически может свидетельствовать о том, что TNF α является не только продуктом дегрануляции тучных клеток, но и участвует на одном из этапов инициации IgE-опосредованного ответа.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. *Papatya Bayrak Degirmenci, Cengiz Kirmaz, Seda Vatansever, Ece Onur, Emine Nal, Soner Erdin, Beyhan Ozyurt.* Analysis of the association of chronic spontaneous urticaria with interlekin-4, -10, transforming growth factor- β 1, interferon- γ , interleukin-17A and -23 by autologous serum skin test. *Postepy Dermatologii i Alergologii.* 2017, 34(1), 70–76.
2. *Баранова Н. И., Ащина Л. А., Орлова Е. А.* Цитокиновый профиль и показатели Т-клеток у больных аутоиммунной формой хронической крапивницы. Иммунопатология, аллергология, инфектология. 2012, 4, 61–65. [*Baranova N. I., Aschina L. A., Orlova E. A.* Cytokine profile and T-cell indices in patients with an autoimmune form of chronic urticaria. *Immunopathology, allergology, infectology.* 2012, 4, 61–65].
3. *Atwa M. A., Emara A. S., Youssef N., Bayoumy N. M.* Serum concentration of IL-17, IL-23 and TNF- α among patients with chronic spontaneous urticaria: association with disease activity and autologous serum skin test. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2014, 28(4), 469–74.
4. *Kolkhir P., André F., Church M. K., Maurer M., Metz M.* Potential blood biomarkers in chronic spontaneous urticaria. *Clin Exp Allergy.* 2017, 47(1), 19–36.

CYTOKINES IN THE PATHOGENESIS OF SPONTANEOUS URTICARIA

© 2019 A. E. Krivonkina^{1*}, S. M. Yudina², A. M. Bakhirev³

*E-mail: Krivonkina@yandex.ru

¹State Budget Institution of Health Care of the Republic of Karelia
“Emergency Hospital” Petrozavodsk, Russia;

²Federal State Budget Educational Institution of Higher Education
“Kursk State Medical University”, Kursk, Russia;

³Federal State Budget Educational Institution of Higher Education “Petrozavodsk
State University” Medical Institute, Petrozavodsk, Russia

Received: 27.02.2019. Accepted: 13.03.2019

IL-4 and TNF α cytokines are involved in the pathogenesis of spontaneous urticaria and can be considered as potential biomarkers of the disease.

Key words: urticaria, cytokines, serum IgE

Authors:

Krivonkina E. A., ✉ allergist-immunologist State Budget Institution of Health Care of the Republic of Karelia “Emergency Hospital” Petrozavodsk, Russia. E-mail: Krivonkina@yandex.ru;

Yudina S. M., doctor of medical sciences, professor, Head of the Department of Clinical Immunology, Allergology and Phthiisopulmonology Federal State Budget Educational Institution of Higher Education “Kursk State Medical University”, Kursk, Russia;

Bakhirev A. M., PhD, docent, Department of Faculty Therapy, Phthiisiology, Infectious Diseases and Epidemiology Federal State Budget Educational Institution of Higher Education “Petrozavodsk State University” Medical Institute, Petrozavodsk, Russia.

РЕАКЦИЯ КЛЕТОЧНЫХ ФАКТОРОВ ВРОЖДЕННОГО И АДАПТИВНОГО ИММУНИТЕТА ПОРОСЯТ НА ВВЕДЕНИЕ ПРЕПАРАТА «АНАНДИН»

© 2019 г. О. В. Крячко*, Р. М. Хоменко

*E-mail: pathophys-spbgavm@yandex.ru

ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины» Минсельхоза РФ, Санкт-Петербург, Россия

Поступила: 14.03.2019. Принята: 27.03.2019

Цель настоящего исследования — изучить влияние препарата «Анандин» на некоторые клеточные факторы врожденного и адаптивного иммунитета у поросят. «Анандин» — препарат из группы иммуномодуляторов, содержащий два вида соединений — это производные акридонуксусной кислоты, а также азотсодержащие α-Д-глюкофуразы. Для опыта было отобрано 30 поросят за 15 дней до отъема (возраст 40 дней). Масса и физиологическое состояние животных было одинаковым. Исследование предусматривало однократное введение 10% раствора «Анандина» подопытной группе животных в дозе 15 мг/кг живой массы. Контрольная группа была интактной. До и после введения препарата были проведены лабораторные исследования крови. Результаты исследований показали, что применение «Анандина» оказывает положительное влияние на показатели, характеризующие клеточные факторы адаптивного и врожденного иммунитета. Исследуемые параметры: активность кислородзависимых и кислороднезависимых бактерицидных систем нейтрофилов (ЛКТ и НСТ-стимулированный), продукция лимфокинов в РТМЛ, удаление антигенов (уровень циркулирующих иммунных комплексов).

Ключевые слова: врожденный иммунитет, адаптивный иммунитет, клеточные факторы, «Анандин», поросята

DOI: 10.31857/S102872210006685-8

Адрес: 196084 Санкт-Петербург ул. Черниговская, д.5, ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины» Минсельхоза РФ, Санкт-Петербург, Россия, кафедра патологической физиологии, Крячко Оксана Васильевна.

Тел./факс: +7(812) 3882086, 89112801843 (моб.).

E-mail: pathophys-spbgavm@yandex.ru

Авторы:

Крячко О. В., д.в.н., проф., заведующая кафедрой патологической физиологии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины» Минсельхоза РФ, Санкт-Петербург, Россия;

Хоменко Р. М., к.в.н., ассистент кафедры патологической физиологии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины» Минсельхоза РФ, Санкт-Петербург, Россия.

ВВЕДЕНИЕ

В поддержании постоянства внутренней среды и резистентности организма, участвуют различные системы органов. Защитно-адаптивные реакции, направленные на сохранение гомеостаза при различных патогенных воздействиях экзогенных и эндогенных факторов на организм,

напрямую зависят от состояния врожденного и адаптивного иммунитета, что характеризуется активностью клеточного звена иммунной системы [1–3]. Отъем поросят от маток в возрасте 55 дней является критическим для молодняка и способен вызвать снижение реактивности организма. Этот период называют стрессовым [1, 2]. Ранее проведенные исследования показывают, что при раннем отъеме, более глубоко протекает этот критический период и может вызвать более пагубные последствия.

Цель настоящего исследования — изучить влияние иммуномодулятора «Анандин» на клеточные показатели, характеризующие состояние врожденного и адаптивного иммунитета у поросят в критический период отъема.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводились в условиях одного из крупных свиноводческих предприятий Ленинградской области. Группе из 30 поро-

сят в возрасте 40 суток (за 15 дней до отъема) были сделаны инъекции «Анандина» (10% раствор) однократно внутримышечно в дозировке 15 мг/кг живой массы. Контрольная группа (n=30) была интактной. Условия микроклимата, уход, технология отъема (перевод в свинарники для отъемышей), рацион и другие условия были для обеих групп одинаковыми. До и после введения препарата у поросят отбирали пробы крови и изучали показатели, характеризующие состояние клеточных факторов врожденного и адаптивного иммунитета. Бактерицидность фагоцитов оценивали в ЛКТ-тесте по содержанию лизосомальных катионных белков в нейтрофилах (кислороднезависимая система) и в НСТ-тесте (базальном и стимулированном) по восстановлению нитросинего тетразолия (кислородзависимая система); активность гуморального звена иммунитета определяли по уровню циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК); способность Т-лимфоцитов к продукции лимфокинов определяли в реакции торможения миграции лейкоцитов (РТМЛ) с ФГА и Кон А [4].

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием пакета прикладных программ Microsoft Excel. Различия считали достоверными при $P \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

До начала исследований показатели, характеризующие элиминацию антигенов (ЦИК), продукцию лимфокинов и бактерицидную активность нейтрофилов крови у поросят обеих групп не имели достоверных отличий.

После введения препарата через 14 суток у поросят подопытной группы были отмечены позитивные сдвиги в гуморальном звене адаптивного иммунитета — более активно связывались антигены, что характеризовалось увеличением уровня ЦИК на 9,2% по сравнению с аналогичным показателем у интактных животных. Показатели активности лизосомальных катионных белков были выше — на 7,8%, что характеризовало активизацию кислороднезависимого механизма бактерицидности фагоцитов. Кислородзависимая система бактерицидности нейтрофилов реагировала на введение препарата неодинаково. Базальная продукция кислородных метаболитов в нейтрофилах опытных животных была ниже на 10,2% ($P \leq 0,01$), а стимулированная на 18,5% ($P \leq 0,05$) выше, чем у контрольных. Введение «Анандина» способствовало увеличению продукции лимфокинов Т-лимфоцитами у поросят по-

допытной группы, что выразалось в снижении процента миграции лейкоцитов в РТМЛ с ФГА на 25,6%, а в РТМЛ с КонА — на 8%, по сравнению с показателями контрольной группы.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Исследования, которые мы провели ранее на супоросных свиноматках, показали, что использование «Анандина» позитивно влияет на отдельные клеточные факторы врожденного иммунитета (активности кислородзависимых и кислороднезависимых бактерицидных систем нейтрофилов (ЛКТ и НСТ-стимулированный) [5].

На показатели адаптивного иммунитета в клеточном (продукция лимфокинов в РТМЛ), и его гуморальном звене (процесс удаления антигенов — уровень циркулирующих иммунных комплексов в крови) препарат также оказывал положительное влияние [5].

Таким образом, однократное внутримышечное введение препарата «Анандин» поросятам в возрасте 40 дней (за 15 суток до отъема) в дозировке 15 мг/кг приводило к позитивной иммунологической перестройке со стороны адаптивного и врожденного компонентов иммунной системы поросят в стрессовый для них период отъема и может быть рекомендовано для применения в промышленном свиноводстве.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Смоленцев С. Ю., Роженцов А. Л., Александров Ю. А. Влияние иммуностимуляторов на формирование иммунитета у свиноматок и поросят // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н. Э. Баумана. 2012. Т. 210. С. 215–220. [Smolentsev S. Yu., Rozhentsov A. L., Alexandrov Yu. A. The influence of immunostimulants on the formation of immunity in sows and piglets // Scientific notes of the Kazan State Academy of Veterinary Medicine name Bauman N. 2012 t. 210 p. 215–220. In Russ].
2. Хоменко Р. М. Ветеринарно-гигиеническая оценка использования «Анандина» на свиноматках и поросятах: дис...канд. вет.наук. Санкт-Петербург, 2006.—107 с. [Khomenko R. Veterinary and hygienic assessment of the use of “Anandin” on sows and piglets. PhDthesis: St. Petersburg; 2006, in Russ].
3. Takamatsu H.-H., Denyer M. S., Stirling C. M.A., Nethererton C. L., Oura C. A.L., Lacasta A., Argilaguuet J. M., Rodríguez F., Martins C. Cellular immunity in ASFV responses // Virus Research. 2013. Т. 173. № 1. P. 110–121.
4. Методические рекомендации по проведению иммунологических исследований: Методы оценки Т- и В-систем иммунитета/ Воен.-мед. акад. Подгот. В. Г. Морозов, В. Х. Хавинсон.—Л., 1980.—

- 43 с. [Guidelines for conducting immunological studies: Methods for assessing T-and B-systems of immunity/ Military-medical Academy/ V.G. Morozov, V.H. Khavinson- L., 1980–43p.]
5. Хоменко Р. М., Крячко О. В., Лукоянова Л. А. Влияние препарата «Анандин»® на некоторые иммунологические показатели у свиноматок в период супоросности и лактации. // Международный вестник ветеринарии. 2018. № 3. С. 58–62. [Khomenko R. M., Kryachko O. V., Lukoyanova L. A. The influence of the drug «Anandin»® on some immunological indicators in sows during gestation and lactation// International Bulletin of Veterinary Medicine, 2018. № 3. P. 58–62, in Russ.]

REACTION OF CELLULAR FACTORS IN INNATE AND ADAPTIVE IMMUNITY OF THE PIGLETS ON THE INTRODUCTION OF THE DRUG «ANANDIN»

© 2019 O. V. Kryachko*, R. M. Khomenko

*E-mail: pathophys-spbgavm@yandex.ru

St. Petersburg State Academy of Veterinary Medicine, Sankt-Petersburg, Russia

Received: 14.03.2019. Accepted: 27.03.2019

The purpose of this study is to study the effect of the drug “Anandin” on some cellular factors of innate and adaptive immunity in piglets. “Anandin” is a drug from the group of immunomodulators that contains two types of compounds, these are derivatives of acridone acetic acid, as well as nitrogen-containing α -D-glucosylase. For the experiment, 30 piglets were selected 15 days before weaning (40 days old). The mass and physiological state of the animals was the same. The study involved a single administration of 10% solution “Anandin” experimental group of animals at a dose of 15 mg/kg body weight. The control group was intact. Before and after the introduction of the drug were carried out laboratory blood tests. The results showed that “Anandin” has a positive effect on the performance of cellular factors of immunity. The parameters studied: the activity of oxygen-dependent and oxygen-independent bactericidal systems of neutrophils (LKT and NBT-stimulated), production of lymphokines in RTML, removal of antigens (level of circulating immune complexes).

Key words: innate immunity, adaptive immunity, cellular factors, “Anandin”, pigs

Authors:

Kryachko O. V., ✉ Dr., Prof., Head of the Department of Pathological Physiology, St. Petersburg State Academy of Veterinary Medicine, St. Petersburg, Russia. **E-mail:** pathophys-spbgavm@yandex.ru;

Khomenko R. M., Ph.D., Assistant, Department of Pathological Physiology, St. Petersburg State Academy of Veterinary Medicine, St. Petersburg, Russia.

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛОВ КРОВИ КРОЛИКОВ ПРИ ОДИНОЧНЫХ И КОМБИНИРОВАННЫХ СТРЕССОРНЫХ ВОЗДЕЙСТВИЯХ

© 2019 г. О. В. Крячко*, Л. А. Лукоянова, А. М. Таран

*E-mail: pathophys-spbgavm@yandex.ru

ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины»
Минсельхоза РФ, Санкт-Петербург, Россия

Поступила: 14.03.2019. Принята: 02.04.2019

Цель настоящего исследования — изучить влияние одиночных и комбинированных стрессовых воздействий на функции нейтрофилов крови кроликов в эксперименте. Для эксперимента использовали 10 кроликов-самцов, возраст — 8 месяцев, живая масса $3,40 \pm 0,73$ кг. Транспортный стресс первой серии исследований вызывали перевозкой животных в легковом автомобиле. Во второй серии модель иммобилизационного стресса была достигнута за счет фиксирования животного за конечности в спинном положении к станку для мелких животных. В заключительной третьей серии проводили комбинацию воздействий (иммобилизация, затем, через трое суток, транспортировка). Определяли фагоцитарную активность нейтрофилов крови, фагоцитарный индекс, индекс переваривания (киллинг). Показано, что комбинация стрессовых воздействий негативно влияет не только на фагоцитарную активность нейтрофилов непосредственно при их наслоении, но и на восстановление функциональных систем фагоцитов крови в постстрессовый период по сравнению с одиночными стрессами.

Ключевые слова: стресс, кролики, нейтрофилы, фагоцитоз

DOI: 10.31857/S102872210006684-7

Адрес: 196084 Санкт-Петербург ул. Черниговская, д.5, ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины» Минсельхоза РФ, Санкт-Петербург, Россия, кафедра патологической физиологии, Крячко Оксана Васильевна.
Тел./факс: +7(812) 388 20 86, 8 911 280 18 43 (моб.).
E-mail: pathophys-spbgavm@yandex.ru

Авторы:

Крячко О. В., д.в.н., проф., заведующая кафедрой патологической физиологии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины» Минсельхоза РФ, Санкт-Петербург, Россия;

Лукоянова Л. А., к.в.н., доцент кафедры патологической физиологии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины» Минсельхоза РФ, Санкт-Петербург, Россия;

Таран А. М., аспирант кафедры патологической физиологии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины» Минсельхоза РФ, Санкт-Петербург, Россия.

ВВЕДЕНИЕ

Изучение однократного и множественного воздействия стрессовых факторов на живой организм — актуальнейшая проблема биологии

и ветеринарии. Очень сильное или продолжительное стрессовое воздействие способствует снижению адаптационных возможностей организма, приводит к нарушению нормального функционирования органов и тканей, и в итоге может стать причиной возникновения различных заболеваний у людей и животных (1, 3, 4, 5) [1–4].

Цель настоящего исследования — изучить влияние одиночных и комбинированных стрессовых воздействий на функции нейтрофилов крови кроликов в эксперименте.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводились на кафедре патологической физиологии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины». Для эксперимента использовали 10 кроликов-самцов, возраст — 8 месяцев, живая масса $3,40 \pm 0,73$ кг. Животные содержались в виварии кафедры на стандартной диете, рекомендованной для этого вида живот-

ных. Все экспериментальные исследования на животных проводились в соответствии с Директивой Европейского парламента и Совета Европейского союза 2010/63 / ЕС по защите животных, используемых в научных целях.

Исследования состояли из трех серий опытов с моделированием транспортного, иммобилизационного стрессов и их комбинации. В первой серии опытов моделировали транспортный стресс (перевозка животных в легковом автомобиле). Во второй серии модель иммобилизационного стресса была достигнута за счет фиксации животного за конечности в спинном положении к станку для мелких животных. В заключительной третьей серии проводили комбинацию воздействий (иммобилизация, затем, через трое суток, транспортировка). На третий день после иммобилизационного воздействия проводили транспортировку и наблюдали за восстановлением основных функциональных систем нейтрофилов. Определяли фагоцитарную активность нейтрофилов крови (ФА), фагоцитарный индекс (ФИ), индекс переваривания (киллинг) (ИП) по методике Н. И. Латышевой и А. А. Гогочкиной.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием стандартной компьютерной программы, определяли среднее арифметическое (M), ошибку средней арифметической (m), достоверность различий по критерию Стьюдента (t).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Нами было установлено, что при одиночных стрессовых воздействиях (транспортировка, иммобилизация) в обеих группах животных достоверно возрастали показатели, характеризующие фагоцитарную активность нейтрофилов. Так, непосредственно в момент воздействия стрессового агента, мы регистрировали увеличение переваривающей активности нейтрофилов, ИП у кроликов, подвергшихся транспортировке, был достоверно выше в 2,34 раза и составил $1,87 \pm 0,48\%$ ($p < 0,05$), против интактных – $0,79 \pm 0,34\%$. При иммобилизации кроликов мы наблюдали достоверное увеличение адгезивной способности нейтрофилов особенно через 30 минут инкубации на $7,5\%$ ($p < 0,05$) до $71,6 \pm 2,90$ ед. Другие изученные показатели активности нейтрофилов непосредственно в момент моделирования стресса не претерпевали существенных изменений.

Спустя сутки после проведения стрессирующих воздействий, мы наблюдали тенденцию

к снижению всех изученных показателей (фагоцитарная активность и фагоцитарный индекс через 30 и 60 минут инкубирования, индекс переваривания) – показатели практически достигали исходных значений к третьим суткам с момента начала модельных опытов и на седьмые и четырнадцатые сутки эксперимента не отличались от таковых до его начала.

При моделировании комбинированного стресса на третьи сутки, после иммобилизации, дополнительно проводили транспортный стресс. Непосредственно во время наложения стрессовых воздействий наблюдали достоверную депрессию изучаемых показателей. Адгезивная способность нейтрофилов через 30 минут инкубации снижалась на $16,9\%$ ($p < 0,05$) до $49,3 \pm 2,76$ ед., ФА через 60 минут снижалась на $8,05\%$ ($p < 0,05$) до $51,4 \pm 1,72$ ед. Поглощительная активность нейтрофилов также достоверно изменялась: ФИ через 30 минут инкубации уменьшился на $38,4\%$ ($p < 0,05$) до $5,07 \pm 1,25$ ед. Переваривающая активность нейтрофилов во время наложения стрессоров также уменьшалась в 3,4 раза ($p < 0,05$) до $0,23 \pm 0,38\%$. Спустя 7 и 14 суток с момента первого стрессорного воздействия наблюдали тенденцию к восстановлению адгезивной, переваривающей и поглощительной активности к исходным значениям. Однако необходимо отметить, что спустя 7 дней после начала эксперимента по комбинации стрессов ФА через 30 минут инкубации по-прежнему оставалась достоверно меньше исходного уровня на $7,5\%$ ($p < 0,05$) и составила $51,4 \pm 2,61$ ед.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Таким образом, комбинация стрессовых воздействий негативно влияет не только на фагоцитарную активность нейтрофилов непосредственно при их наложении, но и на восстановление функциональных систем фагоцитов крови в постстрессовый период по сравнению с одиночными стрессами. Аналогичная динамика показателей была определена нами при изучении окислительной активности нейтрофилов при одиночных и комбинированных стрессовых воздействиях [5] (2). Волнообразные изменения исследуемых характеристик свидетельствуют о наличии компенсаторных явлений со стороны внутриклеточных структур клеток-фагоцитов. Увеличение адгезивной, поглощительной и переваривающей способностей нейтрофилов в ответ на стрессовые воздействия, приводит к депрессии изученных показателей, что на наш

взгляд связано с повышенным расходом энергетических ресурсов клетки, особенно при наложении воздействий.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Долгушин И. И., Бухарин О. В. Нейтрофилы и гомеостаз // Екатеринбург, 2001.— 277 с. [Dolgushin I. I., Bukharin O. V. Neutrophils and homeostasis // Ekaterinburg, 2001.— 277 p. in Russ.]
2. Tumer C., Bilgin H. M., Obay B. D., Diken H., Atmaca M., Tasdemir E. Macrophage phagocytic activity at acute cold-restraint stress exposed rats: possible of nitric oxide // Biotechnology and Biotechnological Equipment. 2005. Т. 19. № 3. С. 133–138.
3. Borutova R., Faix S., Placha I., Gresakova L., Cobanova K., Leng L. Effects of deoxynivalenol and zearale-
- none on oxidative stress and blood phagocytic activity in broilers // Archives of Animal Nutrition. 2008. Т. 62. № 4. С. 303–312.
4. Baccan G. C., Sesti-Costa R., Chedraoui-Silva S., Mantovani B. Effects of cold stress, corticosterone and catecholamines on phagocytosis in mice: differences between resting and activated macrophages // NeuroImmunoModulation. 2010. Т. 17. № 6. С. 379–385.
5. Крячко О. В., Таран А. М. Сравнительная оценка влияния стрессов различной этиологии на окислительный статус нейтрофилов крови кроликов // Международный вестник ветеринарии. 2018. № 2. С. 91–95. [Kryachko O. V., Taran A. M. Comparative evaluation of the effects of stress of various etiologies in the oxidative status of blood neutrophils of rabbits // International Bulletin of Veterinary Medicine 2018. № 2. P. 91–95, in Russ].

FUNCTIONAL ACTIVITY OF NEUTROPHILS OF BLOOD OF RABBITS WITH SINGLE AND COMBINED STRESS IMPACT

© 2019 O. V. Kryachko*, L. A. Lukyanova, A. M. Taran

*E-mail: pathophys-spbgvm@yandex.ru

St. Petersburg State Academy of Veterinary Medicine, St. Petersburg, Russia

Received: 14.03.2019. Accepted: 02.04.2019

The purpose of this study is to study the effect of single and combined stress effects on the neutrophil function of the blood of rabbits in the experiment. For the experiment used 10 male rabbits, age – 8 months, live weight $3,40 \pm 0,73$ kg. In the first series of experiments, transport stress was modeled by transporting animals in a car. We caused immobilization stress in the second series of experiments by fixing the rabbit with its legs in the supine position. In the third series of experiments, a combination of effects was performed (immobilization, then, after three days, transportation). Phagocytic activity of blood neutrophils, phagocytic index, digestion index (killing) were determined. It was shown that the combination of stress effects negatively affects not only the phagocytic activity of neutrophils directly during their layering, but also the restoration of the functional systems of blood phagocytes in the post-stress period compared to single stresses.

Key words: stress, rabbits, neutrophils, phagocytosis.

Authors:

Kryachko O. V., ✉ Dr., Prof., Head of the Department of Pathological Physiology, St. Petersburg State Academy of Veterinary Medicine, St. Petersburg, Russia. E-mail: pathophys-spbgvm@yandex.ru;

Lukyanova L. A., Ph.D., Associate Professor, Department of Pathological Physiology, St. Petersburg State Academy of Veterinary Medicine, St. Petersburg, Russia;

Taran A. M., graduate student of the Department of Pathological Physiology, St. Petersburg State Academy of Veterinary Medicine, St. Petersburg, Russia.

ИЗМЕНЕНИЯ ПОКАЗАТЕЛЕЙ СИСТЕМНОГО ИММУНИТЕТА ПРИ ПРОВЕДЕНИИ КОСМЕТОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕДУР, ОКАЗЫВАЮЩИХ ВОЗДЕЙСТВИЕ НА КАЧЕСТВО КОЖИ

© 2019 г. Ю. В. Кудревич^{1*}, Е. К. Кузнецова², О. Р. Зиганшин¹,
И. Л. Батурина¹, И. В. Емельянов¹

*E-mail: cyton@rambler.ru

¹ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет»
Минздрава РФ, Челябинск, Россия;

²ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет»
Минздрава РФ, Оренбург, Россия

Поступила: 14.03.2019. Принята: 26.03.2019

В статье рассмотрены изменения показателей системного иммунитета до и после косметологических процедур, проведена сравнительная характеристика изменений количества клеток и их функциональных возможностей при различного рода косметологических процедурах, таких как воздействие лазера, биоревитализации при монотерапии и при их комплексном действии.

Ключевые слова: иммунные клетки, фагоцитарная активность, иммуноглобулины, биоревитализация, эрбиевый лазер

DOI: 10.31857/S102872210006683-6

Адрес: 454020, г. Челябинск, ул. Яблочкина, 24, ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, кафедра дерматовенерологии, Кудревич Юлия Валерьевна. Тел: 8 351 232-00-13.

E-mail: cyton@rambler.ru

Авторы:

Кудревич Ю. В., к.м.н., доцент кафедры дерматовенерологии ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России, г. Челябинск, Россия;

Кузнецова Е. К., к.м.н., ассистент кафедры дерматовенерологии ФГБОУ ВО ОрГМУ Минздрава России, г. Оренбург, Россия;

Зиганшин О. Р., д.м.н., профессор, заведующий кафедрой дерматовенерологии ФГБОУ ВО ЮУГМУ, г. Челябинск, Россия.

ВВЕДЕНИЕ

На сегодняшний день в арсенале врачебной косметологии имеется множество методов с различными механизмами действия, но направленные на достижение единой цели – улучшить внешний вид пациента, уменьшить глубину морщин, признаков фотоповреждения кожи, уменьшить проявления возрастного птоза и т.д. [1–3]. Достаточно хорошо изучены механизмы действия гиалуроновой кислоты, абляционного и неабляционного лазерного воздействия на кожу [4]. При

абляционном фракционном воздействии на кожу происходит повреждение кожи схожее с термической травмой. Изменения иммунных показателей при ожогах описано в большом количестве литературных источников [5], при процедуре биоревитализации так же происходит травмирование кожи в виде многочисленных проколов иглой, а также введение чужеродного материала, поэтому можно предположить, что при лазерном воздействии и при биоревитализации будут происходить изменения показателей системного иммунитета.

Цель нашей работы: 1. Сравнить выраженность изменения иммунных показателей при методиках с различными механизмами действия; 2. Оценить изменения системного иммунитета при действии одного метода и при комплексном воздействии методов, влияющих на структуру кожи.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследовании принимали участие здоровые женщины, средний возраст которых составил $46,4 \pm 4,12$ лет. Пациентки были разделены на три группы по 12 человек в каждой. Первой

группе пациенток проводилась одна процедура биоревитализации кожи лица препаратом гиалуроновой кислоты (группа «биоревитализация»). Второй группе пациенток проводилась процедура фракционного фототермолиза кожи лица с использованием эрбиевого лазера (Er: YAG, группа «лазер»). Третьей группе пациенток была проведена комплексная терапия, включающая одновременное проведение биоревитализации и фракционного фототермолиза однократно под местной кремовой анестезией (группа «лазер+биоревитализация»). Всем пациентам производился забор крови из локтевой вены до процедуры, на восьмой, четырнадцатый и двадцать первый день после процедуры для исследования иммунологических показателей крови. Оценивалась иммунограмма крови (расширенный вариант – общеклинические показатели: количество форменных элементов крови, их процентное соотношение и абсолютное количество, фагоцитарная активность нейтрофилов, активность и интенсивность фагоцитоза, НСТ-тесты, CD-типирование, иммуноглобулины А, М, G, некоторые компоненты комплемента, ЦИК).

РЕЗУЛЬТАТЫ

При анализе выше перечисленных показателей у пациентов разных групп исследования мы получили следующие данные. Наибольшее снижение палочкоядерных нейтрофилов происходило к четырнадцатому дню в группе пациентов, которым была проведена комплексная терапия – биоревитализация и фракционный фототермолиз. Этот показатель составил $0,14 \pm 0,002$ по сравнению с данными $0,5 \pm 0,03$ и $0,44 \pm 0,04$ в группах «лазер» и «биоревитализация» соответственно. Первоначальные данные составили $1,31 \pm 0,66$. Относительное количество NK-клеток (CD3⁻CD56⁺) в группе «лазер+биоревитализация» увеличилось максимально к четырнадцатому дню и составило $19,91 \pm 1,9\%$ по сравнению с группами «лазер», где, значение этого показателя было $15,85 \pm 2,79\%$ и группой «биоревитализация», в которой этот показатель изменился меньше всего и составил $12,36 \pm 3,01\%$. Первоначально до процедур он был $10,78 \pm 2,46\%$. Так же изменялось абсолютное количество NK-клеток (CD3⁻CD56⁺).

Изменения показателей НСТ-теста нейтрофилов в группах были следующими: снижение процента активности спонтанного НСТ-теста происходило во всех группах максимально к восьмому дню и наиболее выраженное сниже-

ние этого показателя отмечалось в группах «лазер» и «лазер+биоревитализация», он составил в группе «лазер» $17,36 \pm 3,98$, в группе «лазер+биоревитализация» $12,67 \pm 2,58$ и в группе «биоревитализация» $24,25 \pm 1,52$. Через две-три недели показатель восстановился у всех пациентов и стал составлять в среднем $25,5 \pm 1,14\%$. Индекс индуцированного НСТ-теста так же снижался к восьмому дню во всех группах и увеличивался до первоначальных цифр, и даже выше, к четырнадцатому-двадцать первому дню. Активность фагоцитоза снижалась после процедуры во всех группах. Интенсивность фагоцитоза и фагоцитарное число так же снижались, но у этих показателей снижение было более выражено, наиболее выраженное снижение оказалось в группе «лазер». Данные иммуноглобулинов по группам оказались следующими: наиболее выраженное снижение иммуноглобулинов произошло в группе «лазер» к четырнадцатому дню, цифры составили IgA $0,7 \pm 0,05$, IgM $0,7 \pm 0,01$, IgG $6,60 \pm 0,97$ г/л, в группе «лазер+биоревитализация» эти цифры были $2,12 \pm 0,17$, $1,3 \pm 0,31$ и $10,64 \pm 1,55$ соответственно и в группе «биоревитализация» снижение произошло до $2,73 \pm 0,61$, $1,71 \pm 0,25$ и $8,16 \pm 0,67$ соответственно. Первоначальные средние значения иммуноглобулинов были: IgA $3,11 \pm 0,73$, IgM $2,22 \pm 0,47$ и IgG $16,09 \pm 1,66$.

ОБСУЖДЕНИЕ

Все исследуемые процедуры значительным образом влияют на показатели системного иммунитета, в основном на функциональные возможности иммунных клеток. Ранний реабилитационный период, который составляет около 7–10 дней, является наиболее уязвимым для пациентов, особенно для пациентов, получивших более агрессивное воздействие на кожу, которым является комбинированное воздействие.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Кудревич Ю. В., Алексеева Е. Ф. Применение полимолочных нитей «Resorblift» в коррекции птоза мягких тканей лица и субментальной зоны // Южно-Уральский медицинский журнал. 2014. № 3. С. 42–45. [Kudrevich Y. V., Alekseeva E. F. The use of «Resorblift» polylactic yarn in the correction of ptosis of the soft tissues of the face and the submental zone // South Urals Medical Journal. 2014. No. 3. P. 42–45].
2. Нефедьева Ю. В., Зиганшин О. Р., Харлан К. В. Современные пилинги: показания, технология проведения, коррекция осложнений // Учебное пособие для ординаторов – Челябинск, 2016.

- [Nefedeva Yu.V., Ziganshin O. R., Harlan K. V. Modern peelings: indications, technology of carrying out, correction of complications // Textbook for residents – Chelyabinsk, 2016.]
3. Саедгалина О. Т., Осиков М. В., Симонян Е. В. Иммунологические аспекты термической травмы. // Современные аспекты науки и образования. 1016. № 5. С. 1 [Saydgalina O. T., Osikov M. V., Simonyan E. V. Immunological aspects of thermal injury. // Modern aspects of science and education. 1016. № 5. С.1].
 4. Камелина Л. И., Забненкова О. В. Нативная гиалуроновая кислота: метод биоревитализации. // Экспериментальная и клиническая дерматокосметология. 2010. № 4. С. 35–40 [Kamelina L. I., Zabnenkova O. V. Native hyaluronic acid: a method of biorevitalization. // Experimental and clinical dermatocosmetology. 2010. № 4. P. 35–40.]
 5. Соболева М. Ю. Морфологическая характеристика кожи при термической травме у детей. // Журнал анатомии и гистопатологии. 2017. Т. 6. № 2. С. 108–114. [Soboleva M. Y. Morphological characteristics of the skin during thermal trauma in children. // Journal of Anatomy and Histopathology. 2017. Т. 6. No. 2. P. 108–114.]

CHANGES IN THE INDICES OF SYSTEMIC IMMUNITY DURING COSMETIC PROCEDURES AFFECTING THE QUALITY OF THE SKIN

© 2019 Y. V. Kudrevich^{1*}, E. K. Kuznetsova², O. R. Ziganshin¹

*E-mail: cyton@rambler.ru

¹Federal State Budget Educational Institution of Higher Education «South Ural State Medical University» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Chelyabinsk, Russia;

²Federal State Budget Educational Institution of Higher Education «Orenburg State Medical University» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Orenburg, Russia

Received: 14.03.2019. Accepted: 26.03.2019

In the article changes in the indices of systemic immunity before and after cosmetic procedures are considered, the comparative characteristic of changes in the number of cells and their functional capabilities for various types of cosmetology procedures, such as laser exposure, biorevitalization with monotherapy and with their complex action, changes in the quantitative content of different clusters of immune cells and their phagocytic activity were noted. An evaluation of the changes in immunoglobulins in the blood before and after cosmetic procedures aimed at improving the quality of the skin.

Key words: immune cells, phagocytic activity, immunoglobulins, biorevitalization, erbium laser

Authors:

Kudrevich Y. V., ✉ Candidate of Medical Science, Associate Professor of the Department of Dermatovenereology of the FPHSS of the Russian Federation Ministry of Health, Chelyabinsk, Russia. **E-mail:** cyton@rambler.ru;

Kuznetsova E. K., Candidate of Medical Science, Assistant of the Department of Dermatovenereology, FSEE of the Russian Federation, OrgMU of the Ministry of Health of Russia, Orenburg, Russia;

Ziganshin O. R., D.M.S., Professor, Head of the Department of Dermatovenereology of the FPHSS of the Russian Federation Chelyabinsk, Russia.

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПОКАЗАТЕЛЕЙ СИСТЕМНОГО ИММУНИТЕТА И ИММУНИТЕТА КОЖИ ДО И ПОСЛЕ ПРОЦЕДУРЫ БИОРЕВИТАЛИЗАЦИИ

© 2019 г. Ю. В. Кудревич^{1*}, Е. К. Кузнецова², О. Р. Зиганшин¹,
Г. В. Сычугов¹, Т. А. Заяц¹, А. И. Емелина¹

*E-mail: cyton@rambler.ru

¹ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет»
Минздрава РФ, Челябинск, Россия;

²ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет»
Минздрава РФ, Оренбург, Россия

Поступила: 14.03.2019. Принята: 01.04.2019

В исследовании принимали участи здоровые женщины, средний возраст $45,0 \pm 3,41$ год. Все пациентки получили однократную процедуру биоревитализации кожи лица, были оценены некоторые показатели системного и тканевого иммунитета. При анализе количества иммунных клеток в коже до и после процедуры было обнаружено увеличение в два раза количества $CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$, количество $CD20^+$ практически не менялось. При оценке иммуноглобулинов М, G в коже до и после процедуры наблюдалось снижение этих показателей, в то время как IgA практически не менялся. Результаты по содержанию иммуноглобулинов в коже сочетаются с результатами по содержанию тех же показателей в крови. При оценке показателей клеточного иммунитета крови выяснилось, что клеточный состав крови практически не меняется. Достоверные изменения произошли только в содержании абсолютного и относительного количества $CD3^+CD56^+$. Эти показатели достоверно увеличились.

Ключевые слова: биоревитализация, системный иммунитет, клеточный иммунитет кожи, иммуноглобулины кожи

DOI: 10.31857/S102872210006682-5

Адрес: 454020, г. Челябинск, ул. Яблочкина, 24, ФГБОУ ВО ЮУГМУ, кафедра дерматовенерологии, Кудревич Юлия Валерьевна. Тел: 8 351 232-00-13.

E-mail: cyton@rambler.ru

Авторы:

Кудревич Ю. В., к.м.н., доцент кафедры дерматовенерологии ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России, Челябинск, Россия;

Кузнецова Е. К., к.м.н., ассистент кафедры дерматовенерологии ФГБОУ ВО ОрГМУ Минздрава России, Оренбург, Россия;

Зиганшин О. Р., д.м.н., профессор, заведующий кафедрой дерматовенерологии ФГБОУ ВО ЮУГМУ, Челябинск, Россия;

Сычугов Г. В., к.м.н., ассистент кафедры патологической анатомии и судебной медицины ФГБОУ ВО ЮУГМУ, Челябинск, Россия;

Заяц Т. А., ординатор кафедры патологической анатомии и судебной медицины ФГБОУ ВО ЮУГМУ, Челябинск, Россия;

Емелина А. И., ординатор кафедры патологической анатомии и судебной медицины ФГБОУ ВО ЮУГМУ, Челябинск, Россия.

ВВЕДЕНИЕ

В зарубежной литературе можно встретить немногочисленные публикации, в которых описываются результаты гистологического исследования кожи до и после процедуры [1, 2, 3]. При поиске статей, в которых бы описывались показатели тканевого иммунитета, мы обнаружили только одну статью, в которой авторы исследовали количество содержания провоспалительных $IL-1$ и $IL-6$ в коже до и после биоревитализации [4]. Авторами было отмечено снижение количества указанных интрелейкинов.

Цель исследования: оценить изменения показателей иммунитета кожи при биоревитализации, а так же сопоставить эти изменения с изменениями в системном иммунитете у пациентов, получивших процедуру биоревитализации.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследовании принимали участие 15 пациенток, средний возраст составил $45,0 \pm 3,41$ год. Все пациентки получили однократную процедуру биоревитализации кожи лица. У всех пациенток забиралась венозная кровь до процедуры, на 7, 14 и 21 день после процедуры для оценки показателей системного иммунитета, а также забору для исследования подвергалась кожа правой заушной области, в проекции сосцевидного отростка. Кожа данной области также обрабатывалась биоревитализантом. Забор кожи производился до процедуры и через 1,5 месяца после процедуры [5].

РЕЗУЛЬТАТЫ

При анализе количества иммунных клеток в коже до и после процедуры мы получили следующие результаты: плотность инфильтрата $CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$ и $CD20^+$ клеток была $149,97 \pm 35,30$ $CD3/mm^2$, $128,09 \pm 21,63$ $CD4/mm^2$, $39,06 \pm 8,46$ $CD8/mm^2$ и $3,07 \pm 0,53$ $CD20/mm^2$ соответственно. Через 1,5 месяца после однократной процедуры биоревитализации кожи эти все показатели, кроме $CD20$ значительно увеличились и стали $304,44 \pm 91,34$ $CD3/mm^2$, $264,01 \pm 45,07$ $CD4/mm^2$, $65,67 \pm 16,44$ $CD8/mm^2$. Изменения достоверны. При оценке иммуноглобулинов М, G в коже до и после процедуры наблюдалось снижение этих показателей, в то время как IgA практически не менялся. Так IgA до процедуры составил $5,09 \pm 0,37$ объемной плотности после процедуры он стал $5,49 \pm 0,46$, IgM до процедуры был $5,27 \pm 0,46$, после процедуры он достоверно снизился до величины $4,05 \pm 0,52$, а IgG до процедуры составлял $2,37 \pm 0,50$, после процедуры наблюдалась тенденция к снижению до $1,96 \pm 0,32$.

Результаты по содержанию иммуноглобулинов в коже сочетаются с результатами по содержанию тех же показателей в крови. Анализ количества иммуноглобулинов показал постепенное снижение этих показателей в сравнении с первоначальными цифрами (до процедуры) к восьмому и четырнадцатому дню, повышения этих цифр после процедуры не происходило.

Данные по клеточному составу в коже и крови разнятся. При оценке клеточного иммунитета выяснилось, что клеточный состав крови практически не меняется ни на восьмой, ни на четырнадцатый, ни на двадцать первый день после процедуры в сравнении с теми же показателями, взятыми до процедуры. Некоторые колебания на-

блюдались у таких показателей как абсолютные и относительные Т-НК клетки ($CD3^+CD56^+$), Т-хелперы ($CD3^+CD4^+$), Т-цитотоксические ($CD3^+CD8^+$), В-лимфоциты ($CD3^-CD19^+$).

ОБСУЖДЕНИЕ

Процедура биоревитализации приводит к достоверному увеличению НК-клеток и снижению количества иммуноглобулинов к 21 дню после процедуры биоревитализации по сравнению с такими же показателями до процедуры, что, вероятно, происходит в результате поступления в организм биосинтетической гиалуроновой кислоты, которая является чужеродным веществом для организма человека. В то же время происходит достоверное увеличение количества иммунных клеток в коже после биоревитализации. Это усиливает иммунологический барьер кожи и способствует усилению сопротивляемости тканевого иммунитета различным патологическим агентам.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Deglesne P.A., Arroyo R., Ranneva E., Deprez P. In vitro study of RRS HA injectable mesotherapy /biorevitalization product on human skin fibroblasts and its clinical utilization // Clin Cosmet Investig Dermatol. 2016 Feb 23;9:41–53.
2. El-Domyati M., El-Ammavi T.S., Moawad O., El-Fakahany H., Medhat W., Mahoney M.G., Uitto J. Efficacy of mesotherapy in facial rejuvenation: a histological and immunohistochemical evaluation // Int J Dermatol.—2012.—Aug; 51(8):913–9.
3. Savoia A., Landis S., Baldi A. A new minimally invasive mesotherapy technique for facial rejuvenation // Dermatol Ther (Heidelb).—2013.—Jan 8;3(1):83–93.
4. Гизингер О.А., Шишкова Ю.С., Липская А.Д., Зиганшин О.Р., Черновол П.Ю., Кудревич Ю.В., Летяева О.И. Клинико-микробиологические особенности состояния кожи лица у женщин до и после процедуры инвазивной биоревитализации // Южно-Уральский медицинский журнал.— 2015.— № 3.— С. 33–36. [Gizinger O.A., Shishkova Yu.S., Lipskaya A.D., Ziganshin O.R., Chernovol P.Yu., Kudrevich Yu.V., Letyaeva O.I. Clinico-microbiological features of the skin condition of women before and after the procedure of invasive biorevitalization // South Urals Medical Journal.— 2015.— No. 3.— P. 33–36.]
5. Кудревич Ю.В., Сычугов Г.В., Зиганшин О.Р., Заяц Т.А. Изменения структурных показателей кожи при воздействии биоревитализации // Уральский медицинский журнал.— 2016.— № 3 (136).— С. 117–121. [Kudrevich Yu.V., Sychugov G.V., Ziganshin O.R., Zayats T.A. Changes in the structural parameters of the skin under the influence of biorevitalization A. Ural Medical Journal.— 2016.— No. 3 (136).— P. 117–121.]

**COMPARATIVE CHARACTERISTICS OF THE INDICES
OF SYSTEMIC IMMUNITY AND SKIN IMMUNITY BEFORE
AND AFTER THE PROCEDURE OF BIOREVITALIZATION**

© 2019 Y. V. Kudrevich^{1*}, E. K. Kuznetsova², O. R. Ziganshin¹, G. V. Sychugov¹,
T. A. Zayats¹, A. I. Emelina¹

*E-mail: cyton@rambler.ru

¹Federal State Budget Educational Institution of Higher Education "South Ural State Medical University"
of the Ministry of Health of the Russian Federation, Chelyabinsk, Russia;

²Federal State Budget Educational Institution of Higher Education "Orenburg State Medical University"
of the Ministry of Health of the Russian Federation, Orenburg, Russia

Received: 14.03.2019. **Accepted:** 01.04.2019

The study involved healthy women, the average age of whom was 45.0 ± 3.41 . All patients received a single procedure for the biorevitalization of the facial skin. Some indicators of systemic and tissue immunity were evaluated. When analyzing the number of immune cells in the skin before and after the procedure, the amount of CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ was doubled. The amount of CD20⁺ remained practically unchanged. When assessing immunoglobulins M, G in the skin before and after the procedure, a decrease in these indicators was observed. IgA practically did not change. The amount of immunoglobulins in the skin changed as well as in the blood. It decreased. When assessing the parameters of cellular immunity of blood, it was found out that the cellular composition of the blood does not practically change. Significant changes occurred only in the absolute and relative amount of CD3⁻CD56⁺. These indicators significantly increased.

Key words: biorevitalization, systemic immunity, cellular immunity of the skin, skin immunoglobulins

Authors:

Kudrevich Y. V., ✉ Candidate of Medical Science, Associate Professor of the Department of Dermatovenereology of the FPHSS of the Russian Federation Ministry of Health, Chelyabinsk, Russia. **E-mail:** cyton@rambler.ru;

Kuznetsova E. K., Candidate of Medical Science, Assistant of the Department of Dermatovenereology, FSEE of the Russian Federation, OrgMU of the Ministry of Health of Russia, Orenburg, Russia;

Ziganshin O. R., d.m.s., Professor, Head of the Department of Dermatovenereology of the FPHSS of the Russian Federation Chelyabinsk, Russia;

Sychugov G. V., Candidate of Medical Science, Assistant of the Department of Pathological Anatomy and Forensic Medicine of the FPHSS of the Russian Federation, Chelyabinsk, Russia;

Zayats T. A., resident of the Department of Pathological Anatomy and Forensic Medicine of the FPHSS of the Russian Federation, Chelyabinsk, Russia;

Emelina A. I., resident of the Department of Pathological Anatomy and Forensic Medicine of the the FPHSS of the Russian Federation, Chelyabinsk, Russia.

ВЛИЯНИЕ ГЛУТАМИЛ-ТРИПТОФАНА НА СЕКРЕЦИЮ ЦИТОКИНОВ, ПАРАМЕТРЫ РАНОЗАЖИВЛЕНИЯ И АНТИОКСИДАНТНУЮ СИСТЕМУ *IN VITRO* И *IN VIVO*

© 2019 г. Т. А. Кудрявцева^{1*}, Э. А. Старикова², И. В. Воронкина³,
В. С. Смирнов¹

*E-mail: tkudriavtceva@cytomed.ru

¹ЗАО «МБНПК «Цитомед», Санкт-Петербург, Россия;

²ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия;

³ФГБУН Институт Цитологии Российской Академии Наук, Санкт-Петербург, Россия

Поступила: 28.02.2019. Принята: 13.03.2019

Дипептид глутамил-триптофан, оказывает позитивное влияние на метаболические процессы в клетках, стимулирует функциональную активность клеток иммунной системы, восстанавливает нарушения в антиоксидантной системе организма, улучшает процессы регенерации тканей, ускоряет заживление ран, активизирует функции клеток соединительной ткани, эндотелиоцитов, макрофагов и лейкоцитов в очаге повреждения.

Ключевые слова: глутамил-триптофан, тимоген, ICAM-1, интерлейкины, матриксные металлопротеиназы, регенерация, СОД

DOI: 10.31857/S102872210006681-4

Адрес: 199004 Санкт-Петербург, ВО, 4-я линия дом 11, ЗАО «МБНПК «Цитомед», научный отдел, Кудрявцева Татьяна Анатольевна. Тел: 8 (812) 6020593 доб. 246; моб 8921 646 1553
E-mail: tkudriavtceva@cytomed.ru

Авторы:

Кудрявцева Т. А., к.б.н., ведущий научный сотрудник научного отдела ЗАО «МБНПК «Цитомед», Санкт-Петербург, Россия;

Старикова Э. А., к.б.н., старший научный сотрудник отдела иммунологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия;

Воронкина И. В., к.б.н., старший научный сотрудник отдела клеточных культур ФГБУН Институт Цитологии Российской Академии Наук, Санкт-Петербург, Россия;

Смирнов В. С., д.м.н., профессор, руководитель научного отдела, ЗАО «МБНПК «Цитомед», Санкт-Петербург, Россия.

Дипептид глутамил-триптофан (Тимоген натрия, ГТ) хорошо известный препарат, синтезирован методом классического пептидного синтеза в растворе. Препарат обладает отчетливой иммуномодулирующей активностью, выраженными регенеративными свойствами, а также способностью влиять на системы антиоксидантной защиты организма. Эти свойства вместе с хорошим профилем безопасности позволяют активно использовать ГТ в качестве, как самостоятельного

лекарственного средства, так и в виде компонента сложных готовых лекарственных форм (1). При этом плейотропный характер влияния дипептида на организм делает актуальными дальнейшие исследования механизмов реализации этих эффектов в моделях *in vivo* и *in vitro*.

Целью данной работы было изучить клеточные механизмы, опосредующие иммуномодулирующий, регенеративный и антиоксидантный эффекты ГТ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для анализа механизмов иммуномодулирующего действия ГТ было проведено изучение его эффектов в моделях воспаления *in vitro*. Изучали его влияние на спонтанную и индуцированную TNF α секрецию IL-8, IL-6 – моноцитоподобными клетками THP-1 и клетками эпидермоидной карциномы A431; IL-8, IL-6, IL-1 α – эндотелиальными клетками EA.hy 926; IL-8 – мононуклеарными клетками периферической крови здоровых доноров, а также уровень экспрессии на этих клетках адгезионной молекулы ICAM-1, препаратом сравнения выступал актовегин (NYCOMED, Takeda).

Влияние изучаемых препаратов на интенсивность внутриклеточного метаболизма оценивали с помощью МТТ-теста. Статистическая обработка проводилась с использованием программы «STATISTICA 6.0».

Изучение влияния ГТ на процессы ранозаживления проводили, моделируя незаживающую неэпителизируемую рану на здоровых кроликах, и вводя препараты внутрибрюшинно в течение 21 дня эксперимента. Негативный контроль — физиологический раствор, положительный контроль — актовегин. В качестве маркеров процесса ранозаживления оценивали активность матриксных металлопротеиназ (ММП 1, 2, 8, 9). По динамике активности ММП-9 и ММП-1 судили о наличии и действии в тканях раны воспалительных клеток — нейтрофилов и макрофагов. По динамике активности ММП-2 судили о присутствии в ране фибробластов и начале образования грануляционной ткани, а по динамике активности ММП-1 оценивали начало процесса синтеза коллагена и зрелости новообразованной грануляционной ткани.

Способность ГТ влиять на систему антиоксидантной защиты организма оценивали в опытах *in vivo* в моделях водоиммерсионного стресса и индометацинового язвообразования у крыс. В качестве критериев оценки использовали активность СОД (супероксиддисмутаза) и содержание МДА (малонового диальдегида) в сыворотке крови экспериментальных животных.

РЕЗУЛЬТАТЫ

ГТ и актовегин не оказывали токсического влияния на представленные клеточные линии в концентрациях ниже 1,0 мг/мл. ГТ оказывал стимулирующее влияние на клеточный метаболизм EA.hy 926 и A431 в более широком диапазоне от 0,1 нг/мл до 0,1 мг/мл, а клеток ТНР-1 в концентрации 10,0 мкг/мл и 1,0 мкг/мл. Влияние актовегина на секрецию цитокинов IL-8 и IL-6 культурами клеток было разнонаправленным. ГТ в разных концентрациях понижал собственную и индуцированную секрецию обоих цитокинов клетками EA.hy 926 и A431. При этом на спонтанную секрецию цитокинов ТНР-1 клетками препарат оказывал разнонаправленное влияние, но во всех концентрациях усиливал индуцированную TNF α продукцию IL-6. ГТ снижал индуцированную TNF α секрецию IL-1 α , и при этом в аналогичной дозе увеличивал секрецию адгезионной молекулы ICAM-1 эндотелиальными клетками. ICAM-1 (CD54) молекула се-

мейства адгезинов, в физиологических условиях практически не экспрессирующаяся на эндотелиальных клетках. Индукторами для этой молекулы служат, компоненты комплемента, оксид азота, липополисахариды, провоспалительные цитокины (IL-1, -6, -8) и другие медиаторы.

Изучение влияния ГТ на процессы регенерации проводили на здоровых кроликах, моделируя незаживающую неэпителизируемую рану и вводя препараты внутрибрюшинно в течение всего эксперимента (2). Негативный контроль — физиологический раствор, положительный — актовегин. Введение ГТ статистически значимо уменьшало время заживления ран по сравнению с актовегином. Также была отмечена повышенная активность желатиназ (ММП-2, -9) на ранней воспалительной фазе (что способствовало ускоренной очистке раны), и уменьшение ее в фазе ремоделирования. Активность коллагеназ (ММП-1, -8) ГТ снижал только в фазе ремоделирования. Гистологический анализ тканей раны подтвердил ускоренное образование грануляционной ткани и более активную реэпителизацию у животных, получавших ГТ. Полученные результаты показывают, что использование ГТ изменяет процессы ранозаживления, улучшая их результаты.

В экспериментальных моделях водоиммерсионного стресса и индометацинового язвообразования ГТ кроме выраженной гастропротекторной активности влиял на активность ферментов антиоксидантной системы. Использование дипептида полностью нормализовало активность СОД в обеих моделях, как при профилактическом, так и при лечебном введении, и оказывало позитивное влияние на процессы перекисного окисления липидов.

Таким образом, исследуемый дипептид ГТ оказывает позитивное влияние на метаболические процессы в клетках, стимулирует функциональную активность клеток иммунной системы, восстанавливает нарушения в антиоксидантной системе организма, улучшает процессы регенерации тканей, ускоряет заживление ран, активизирует функции клеток соединительной ткани, эндотелиоцитов, макрофагов и лейкоцитов в очаге повреждения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Смирнов В. С., Петленко С. В. Комплексный препарат «Цитовир-3». В кн.: Грипп и острые респираторные вирусные инфекции (характеристика, патогенез, профилактика и лечение), изд. 3-е

- перераб. и доп. – СПб: Гиппократ 2019. 128–163. [Smirnov V. S., Petlenko S. V. Complex drug “Cytovir-3”. In: Influenza and acute respiratory viral infections (characteristics, pathogenesis, prevention and treatment), Гиппократ, St. Petersburg 2019, 128–163]
2. Shevtsov M. A., Smagina L. V., Kudriavtceva T. A., Voronkina I. V. Glu-Trp-ONa or its acylated analogue (R-Glu-Trp-ONa) administration enhances the wound healing in the model of chronic skin wounds in rabbits. *Drug Design, Development and Therapy* 2015:9, 1717–1727.

INFLUENCE OF GLUTAMYL-TRYPTOPHAN ON CYTOKINE SECRETION, WOUND HEALING, AND ANTIOXIDANT SYSTEM *IN VITRO* AND *IN VIVO*

© 2019 T. A. Kudriavtceva¹, E. A. Starikova², I. V. Voronkina³, V. S. Smirnov¹

*E-mail: tkudriavtceva@cytomed.ru

¹ZAO MPSPS CYTOMED, St Petersburg, Russia;

²Institute of Experimental Medicine, St Petersburg, Russia;

³Institute of Cytology of the Russian Academy of Sciences (RAS) St Petersburg, Russia

Received: 28.02.2019. Accepted: 13.03.2019

Dipeptide glutamyl-tryptophan influences on metabolic processes in different cells, stimulates the functional activity of immune cells, restores disorders in the antioxidant system, improves tissue regeneration, accelerates wound healing, activates the functions of connective tissue cells, endotheliocytes, macrophages and leukocytes in the outbreak damage.

Key words: glutamyl-tryptophan, timogen, ICAM-1, interleukins, matrix metalloproteinases, regeneration, SOD

Authors:

Kudriavtceva T. A., ☒ PhD, Chief Scientific Officer Department of Science, ZAO MPSPS CYTOMED, St Petersburg, Russia.
E-mail: tkudriavtceva@cytomed.ru;

Starikova E. A., PhD Leading Researcher Department of Immunology, Institute of Experimental Medicine, St Petersburg, Russia;

Voronkina I. V., PhD Leading Researcher Department of Cell Cultures, Institute of Cytology of the Russian Academy of Sciences (RAS) St Petersburg, Russia;

Smirnov V. S., MD, Professor, Head of Department of Science, ZAO MPSPS CYTOMED, St Petersburg, Russia.

ФЕНОТИПИРОВАНИЕ АНТИГЕН-СПЕЦИФИЧНЫХ ЦИТОТОКСИЧЕСКИХ Т-ЛИМФОЦИТОВ МЕТОДОМ МНОГОЦВЕТНОЙ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ

© 2019 г. М. С. Кузнецова¹, Ю. А. Лопатникова¹, С. В. Сенников^{1,2*}

*E-mail: sennikovsv@gmail.com

¹ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», Новосибирск, Россия;

²ФГАОУ ВО «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», Новосибирск, Россия

Поступила: 15.03.2019. Принята: 03.04.2019

Современные методы многоцветной проточной цитометрии в сочетании с технологиями МНС-мультимеров позволяют не только идентифицировать и выделять популяции цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ), но также вести фенотипическое исследование уровня дифференцировки, функциональных особенностей данных клеток, и даже исследовать распределение субпопуляций Т-клеток памяти внутри популяций, специфичных к конкретным эпитопам опухолевых антигенов. В настоящем исследовании мы оценили уровень дифференцировки и содержание субпопуляций Т-клеток памяти в популяциях цитотоксических Т-лимфоцитов, специфичных к эпитопам антигена HER2/neu (HER2), с использованием метода окрашивания антиген-специфических CD8⁺ Т-лимфоцитов МНС-мультимерами и многоцветной проточной цитометрии. В результате исследования популяции *in vitro* активированных HER2-специфичных ЦТЛ были проанализированы по фенотипу и разделены на основные субпопуляции, выделяемые исследователями в пуле циркулирующих эффекторных CD8⁺ Т-клеток. Полученные HER2-специфичные Т-клетки в значительной степени (порядка 40–50%) имеют фенотип TSCM – популяции, способной к наиболее выраженному противоопухолевому иммунному ответу за счет сочетания эффекторных свойств со способностью к самоподдержанию.

Ключевые слова: цитотоксические Т-лимфоциты, CD8⁺ Т-клетки, фенотипирование Т-клеток памяти, многоцветная проточная цитометрия, МНС-мультимеры, HER2/neu

DOI: 10.31857/S102872210006680-3

Адрес: 630099, Новосибирск, ул. Ядринцевская, д.14., ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», Сенников Сергей Витальевич. Тел.: +7(383) 2221910.

E-mail: sennikovsv@gmail.com

Авторы:

Кузнецова М. С., м.н.с. лаборатории молекулярной иммунологии НИИФКИ, Новосибирск, Россия;

Лопатникова Ю. А., к.б.н., с.н.с. лаборатории молекулярной иммунологии НИИФКИ, Новосибирск, Россия;

Сенников С. В., д.м.н., профессор, заведующий лабораторией молекулярной иммунологии НИИФКИ, Новосибирск, Россия.

Эффекторные CD8⁺ Т-клетки, также обычно описываемые как цитотоксические Т-лимфоциты (ЦТЛ), играют важную роль в реализации противоопухолевого клеточного иммунитета

и при правильной активации способны эффективно уничтожать опухолевые клетки, экспрессирующие опухолевые антигены. Мощност и продолжительность противоопухолевого ответа в значительной степени зависит от уровня дифференцировки и соотношения субпопуляций ЦТЛ. К числу выделяемых исследователями субпопуляций в пуле циркулирующих эффекторных CD8⁺ Т-клеток можно выделить следующие основные: наивные Т-лимфоциты (T_N, CD45RA⁺CD62L⁺CD127⁺CD27⁺CD28⁺CD95⁻), Т-клетки памяти со свойствами стволовых клеток (T_{SCM}, CD45RA⁺CD62L⁺CD127⁺CD27⁺CD28⁺CD95⁺), Т-клетки центральной памяти (T_{CM}, CD45RA⁻CD62L⁺), Т-клетки эффекторной памяти (T_{EM}, CD45RA⁻CD62L⁻) и терминально-дифферен-

цированные цитотоксические Т-лимфоциты (T_{EMRA}, CD45RA⁺CD62L⁻) [1, 2].

Основным методом оценки гетерогенности Т-клеточного пула периферической крови является проточная цитометрия [2, 3]. На сегодняшний день возможно одновременное выявление всех перечисленных субпопуляций циркулирующих Т-клеток памяти по одновременной экспрессии ряда поверхностных маркеров [1, 2]. При этом добавление в цитометрическую панель антител МНС-мультимеров, конъюгированных с молекулами флуорохромов, позволяет прицельно исследовать особенности дифференцировки и субпопуляционный состав антиген-специфических CD8⁺ Т-лимфоцитов.

Целью настоящего исследования стала оценка субпопуляционного состава и содержания Т-клеток памяти внутри популяций HER2-специфических ЦТЛ.

Получение целевых популяций HER2-специфических ЦТЛ производилось по протоколу, разработанному нами ранее [4]. Кратко, ЦТЛ, специфичные к эпитомам E75 и E88 опухолевого антигена HER2/neu, получали с помощью совместного культивирования МНК ПК с аутологичными дендритными клетками, трансфицированными плазмидой, кодирующей эпитопы E75 и E88 HER2/neu.

Для выявления популяции HER2-специфических Т-лимфоцитов совместные культуры МНК и ДК окрашивались МНС-мультимерами технологии Streptamer (Iba, Германия), после чего окрашенные пробы дополнительно метились антителами для фенотипирования цитотоксических Т-клеток и затем анализировались методом проточной цитометрии на приборе BD FACS Verse.

В результате анализа схем цитометрического определения перечисленных субпопуляций Т-клеток, предложенных в научной литературе, для разделения клеток на популяции была подобрана панель антител и реагентов для проточной цитометрии, состоящая из следующих элементов: CD8-Brilliant-Violet-510, CD28-FITC, CD27-PerCP, CD95-PE-Cy7, CD127-APC, CD62L-APC-Cy7, CD45RA-Pacific-Blue и МНС-мультимеры, специфичные к эпитомам

E75 и E88 (Streptamer-PE). Цитометрический анализ HER2-специфических ЦТЛ с использованием описанной панели показал, что популяции активированных E75- и E88-специфических ЦТЛ характеризуются схожим распределением долей исследуемых субпопуляций (3–5% T_N, 4–6% T_{EM}, 9–11% T_{EMRA}, 10–16% T_{CM}, 42–52% T_{SCM}), которое отличается от такового для общей популяции CD8⁺ Т-лимфоцитов существенно более низким содержанием наивных Т-клеток и более высоким содержанием клеток T_{SCM}.

Таким образом, с использованием многоцветной проточной цитометрии и технологии Streptamer было показано, что субпопуляционный состав HER-специфических Т-лимфоцитов характеризуется значительным содержанием (более 40%) Т-клеток памяти со свойствами стволовых клеток и существенно меньшей долей наивных Т-клеток по сравнению с таковым в популяции CD8⁺ Т-клеток периферической крови.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Mahnke Y. D., Brodie T. M., Sallusto F., Roederer M., Lugli E. The who's who of T-cell differentiation: Human memory T-cell subsets // *Eur J Immunol* 2013, 43, 2797–2809.
2. Кудрявцев И. В. Т-клетки памяти: основные популяции и стадии дифференцировки // *Российский иммунологический журнал* 2014, 8(17), 4, 947–964. [Kudryavtsev I. V. Memory T cells: main populations and differentiation stages // *Rus Immunol J* 2014, 8(17), 4, 947–964].
3. Хайдуков С. В., Зурочка А. В., Толоян А. А., Черешнев В. А. Основные и малые популяции лимфоцитов периферической крови человека и их нормативные значения (методом многоцветного цитометрического анализа) // *Медицинская Иммунология* 2009, 11, 2–3, 227–238. [Khaidukov S. V., Zurochka A. V., Totolyan A. A., Chereshev V. A. The main and small populations of human peripheral blood lymphocytes and their normative values (by the method of multicolor cytometric analysis) // *Meditsinskaya Immunologia* 2009, 11, 2–3, 227–238.
4. Kuznetsova M., Lopatnikova J., Khantakova J., Maksyutov R., Maksyutov A., Sennikov S. Generation of populations of antigen-specific cytotoxic T cells using DCs transfected with DNA construct encoding HER2/neu tumor antigen epitopes. // *BMC Immunol* 2017, 18, doi:10.1186/s12865-017-0219-7.

**PHENOTYPING OF ANTIGEN-SPECIFIC CYTOTOXIC T-LYMPHOCYTES
BY THE METHOD OF MULTICOLOR FLOW CYTOMETRY**© 2019 M. S. Kuznetsova¹, J. A. Lopatnikova¹, S. V. Sennikov^{1,2*}**E-mail: sennikovsv@gmail.com*¹*Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russia;*²*Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia***Received:** 15.03.2019. **Accepted:** 03.04.2019

Modern methods of multicolor flow cytometry in combination with MHC multimer technologies allow not only to identify and isolate cytotoxic T-lymphocyte (CTL) populations, but also to conduct phenotypic research on the level of differentiation, functional features of these cells, and even to investigate the distribution of memory T-cell subsets inside populations specific to particular epitopes of tumor antigens. In the present study, we assessed the level of differentiation and the content of memory T-cell subpopulations in cytotoxic T-lymphocyte populations specific for HER2/neu antigen epitopes (HER2) using the MHC-multimers antigen-specific CD8⁺ T-cell staining method and multicolor flow cytometry. The resulting HER2-specific T cells to a large extent (about 40–50%) have the TSCM phenotype, a population capable of the most pronounced antitumor immune response due to a combination of effector properties with self-sustainability.

Key words: cytotoxic T lymphocytes, CD8⁺ T cells, memory T-cell phenotyping, multicolor flow cytometry, MHC multimers, HER2/neu

Authors:

Kuznetsova M. S., junior researcher of the Laboratory of Molecular Immunology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russia;

Lopatnikova J. A., PhD, senior researcher of the Laboratory of Molecular Immunology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russia;

Sennikov S. V., ✉ PhD, MD, professor, head of the Laboratory of Molecular Immunology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russia. **E-mail:** sennikovsv@gmail.com

РЕЦЕПТОРНЫЕ ФУНКЦИИ SEMA4D В КОНТРОЛЕ ПРОЛИФЕРАЦИИ Т-ЛИМФОЦИТОВ

© 2019 г. Е. М. Куклина

E-mail: ibis_07@mail.ru

«Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук» — филиал ФГБУН Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук, Пермь, Россия

Поступила: 01.03.2019. Принята: 12.03.2019

Семафорин IV класса Sema4D широко представлен в иммунной системе как в мембранной, так и в растворимой форме, и контролирует иммунные процессы, реализуя свои эффекты через специфические рецепторы — таковы общепринятые представления. В настоящей работе приведены данные, указывающие на наличие альтернативного способа участия Sema4D в иммунорегуляции: этот способ предполагает функционирование мембранного семафорина в качестве рецептора, проводящего сигнал в клетку, на которой экспрессирован. Обсуждаются возможные механизмы сигнализации с мембранного Sema4D.

Ключевые слова: мембранный Sema4D, Т-лимфоциты, пролиферация, CD45

DOI: 10.31857/S102872210006679-1

Адрес: 614081, Пермь, ул. Голева, д.13, «Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук» — филиал ФГБУН Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук, Куклина Елена Михайловна. Тел./факс: +7 (342) 2809211.

E-mail: ibis_07@mail.ru

Автор:

Куклина Е. М., д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории иммунорегуляции «Института экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук» — филиала ФГБУН Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук, Пермь, Россия.

Семафорин IV класса Sema4D широко представлен в иммунной системе — он конститутивно экспрессируется на мембране иммуноцитов, а при активации клеток переходит за счет протеолитического отщепления в растворимую форму, получая возможность реализации эффектов на системном уровне. Основным рецептором для Sema4D в иммунной системе служит низкоаффинный CD72, а основными мишенями действия семафорина считают клетки, экспрессирующие этот рецептор, — преимущественно В-лимфоциты, моноциты и дендритные клетки [1, 2]. CD72-зависимые эффекты Sema4D задействованы в ключевых событиях адаптивного иммунного ответа — в антигенной активации

В-лимфоцитов [1], в созревании дендритных клеток и в процессах примирования Т-лимфоцитов [2]. Однако участие Sema4D в иммунорегуляции не ограничивается использованием специфических рецепторов для реализации своих эффектов: в настоящей работе представлены данные, указывающие на наличие альтернативного способа участия семафорина в контроле активности лимфоцитов.

В работе исследовался пролиферативный ответ Т-клеток человека на поликлональную активацию на фоне различных форм блокады Sema4D. Т-лимфоциты (CD3⁺-клетки) выделяли из периферической крови здоровых доноров с помощью стандартных коммерческих наборов для фракционирования (“R&D Systems”) и культивировали в присутствии активатора (анти-CD3/CD28, “Invitrogen”) в течение 72 часов. Пролиферацию клеток оценивали по включению 5-бром-2'-дезоксинуридина (BrdU), с помощью коммерческой тест-системы (“Amersham”) — иммуноферментным анализом. BrdU вносили в пробу за 18 часов до окончания культивирования. Результаты представляли в виде индекса пролиферации, то есть отношения показателей для стимулированного и соответствующего спонтанного вариантов. Источником эндоген-

ного Sema4D служили сами Т-лимфоциты, конститутивно экспрессирующие его на мембране и отщепляющие его при активации. Участие эндогенного семафорина в пролиферативном ответе оценивали ингибиторным анализом, за счет внесения в культуру моноклональных антител к семафорину (NBP2-36736SS, “R&D Systems”) или рекомбинантного плексина В2 (5329-РВ, “R&D Systems”), высокоаффинного семафоринного рецептора, эффективно связывающего растворимый Sema4D и блокирующего Sema4D-зависимый сигнал. Проведенные исследования выявили следующие закономерности: если блокада семафорина соответствующими моноклональными антителами приводила к ожидаемому снижению пролиферативного ответа Т-лимфоцитов на поликлональную активацию (индекс пролиферации: $4,53 \pm 1,03$ для пробы без ингибитора и $2,68 \pm 0,729$ на фоне антител к Sema4D, $p=0,05$), подтверждая полученные нами ранее данные, то внесение в культуру рекомбинантного плексина В2 приводило к противоположному эффекту – усилению пролиферации Т-лимфоцитов (индекс пролиферации: $4,53 \pm 1,03$ для пробы без ингибитора и $6,04 \pm 0,883$ на фоне плексина В2, $p < 0,05$). Для объяснения этого противоречия важно разграничить эффекты рекомбинантного плексина и антител к семафорину: оба фактора нейтрализуют растворимый Sema4D, однако при связывании с мембранным семафоринным рекомбинантный плексин может не только блокировать его взаимодействие с рецепторами (как антитела к Sema4D), но и инициировать стимулирующий сигнал. Поэтому полученные результаты свидетельствуют о том, что Sema4D может участвовать в регуляции Т-клеточной пролиферации не только в качестве лиганда, но и как рецептор, проводя сигнал в клетку, на которой экспрессирован.

Существование такого механизма подтверждается и рядом данных литературы. Так, показано, что перекрестное связывание Sema4D на мембране Т-лимфоцитов вызывает активирующий сигнал в самих Т-клетках, в частности, усиливает пролиферацию этих клеток в ответ на субоптимальные дозы антител к CD3 (компоненту Т-клеточного рецепторного комплекса) и к CD2 (Т-клеточному мембранному антигену, взаимодействующему с LFA-3) [3], а в эпидермальных $\gamma\delta$ Т-лимфоцитах Sema4D-зависимый сигнал в ответ на связывание с плексином В2, представленным на мембране кератиноцитов, инициирует морфологические изменения, та-

кие как втягивание дендритов и округление клеток, что необходимо для их пролиферации и миграции в сайт повреждения [4]. По механизмам реализации сигнала с мембранного Sema4D на сегодняшний день данных очень мало. Фактически, имеется только одна работа, в которой сделана попытка их расшифровать – на эпидермальных $\gamma\delta$ Т-лимфоцитах: показано, что связывание Sema4D на мембране этих клеток сопровождается фосфорилированием экстраклеточно-регулируемой киназы (extracellular signal-regulated kinase, ERK), ключевого элемента каскада митоген-активируемых протеинкиназ, дефосфорилированием актин-связывающего белка кофилина и активацией α - и β 4-интегринов [4], причем активация ERK – необходимое условие для Sema4D-зависимых морфологических изменений в клетке, обеспечивающих ее миграцию и пролиферацию [4].

Теоретически, способность семафорина выступать в качестве рецептора может обеспечиваться как минимум двумя факторами: во-первых, цитоплазматический домен семафорина содержит консенсусные сайты для серинового фосфорилирования [5]; во-вторых, у Т-лимфоцитов Sema4D ассоциирован с тирозиновой фосфатазой CD45, которая также может участвовать в передаче семафорин-зависимого сигнала в клетку [3, 6]. А поскольку CD45 участвует в ответе лимфоцитов на антиген, мембранный Sema4D должен вносить вклад этот ответ. Представленные выше данные указывают на необходимость пересмотра роли семафорина в иммунорегуляции, с учетом вклада рецепторной функции Sema4D в этот процесс, а также изучения механизмов сигнализации с мембранного семафорина.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-015-00379 и в рамках государственного задания номер госрегистрации темы: 01201353248.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Kumanogoh A., Watanabe C., Lee I., Wang X., Shi W., Araki H., Hirata H., Iwahori K., Uchida J., Yasui T., Matsumoto M., Yoshida K., Yakura H., Pan C., Parnes J. R., Kikutani H. Identification of CD72 as a lymphocyte receptor for the class IV semaphorin CD100: a novel mechanism for regulating B cell signaling. *Immunity*. 2000, 13(5), 621–631.
2. Kumanogoh A., Shikina T., Watanabe C., Takegahara N., Suzuki K., Yamamoto M., Takamatsu H., Prasad D. V., Mizui M., Toyofuku T., Tamura M., Watanabe D., Parnes J. R., Kikutani H. Requirement for CD100-CD72 interactions in fine-tuning of B-cell an-

- tigen receptor signaling and homeostatic maintenance of the B-cell compartment. *Int Immunol.* 2005, 17(10), 1277–1282.
3. Herold C., Elhabazi A., Bismuth G., Bensussan A., Boumsell L. CD100 is associated with CD45 at the surface of human T lymphocytes. Role in T cell homotypic adhesion. *J Immunol.* 1996, 157(12), 5262–5268.
 4. Witherden D.A., Watanabe M., Garijo O., Rieder S.E., Sarkisyan G., Cronin S.J., Verdino P., Wilson I.A., Kumanogoh A., Kikutani H., Teyton L., Fischer W.H., Havran W.L. The CD100 receptor interacts with its plexin B2 ligand to regulate epidermal $\gamma\delta$ T cell function. *Immunity.* 2012, 37(2), 314–325.
 5. Elhabazi A., Delaire S., Bensussan A., Boumsell L., Bismuth G. Biological activity of soluble CD100. I. The extracellular region of CD100 is released from the surface of T lymphocytes by regulated proteolysis. *J Immunol.* 2001, 166(7), 4341–4347.
 6. Billard C., Delaire S., Raffoux E., Bensussan A., Boumsell L. Switch in the protein tyrosine phosphatase associated with human CD100 semaphorin at terminal B-cell differentiation stage. *Blood.* 2000, 95(3), 965–972.

RECEPTOR FUNCTIONS OF SEMA4D IN THE CONTROL OF T-LYMPHOCYTE PROLIFERATION

© 2019 E. M. Kuklina

E-mail: ibis_07@mail.ru

“Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch, Russian Academy of Sciences”, Perm, Russia

Received: 01.03.2019. **Accepted:** 12.03.2019

Class IV semaphoring Sema4D is widely represented in the immune system, both in membrane and in soluble form, and controls immune processes, realizing its effects through specific receptors – these are generally accepted ideas. This paper presents data indicating the presence of an alternative way of Sema4D involving immunoregulation: this way suggests the functioning of membrane semaphorin as a receptor, which conducts a signal into the cell it is expressed on. Possible signaling mechanisms from membrane Sema4D are discussed.

Key words: membrane Sema4D, T lymphocytes, proliferation, CD45

Author:

Kuklina E. M., Doctor of Biology, Leading Researcher, Laboratory of Immunoregulation, «Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch, Russian Academy of Sciences», Perm, Russia.

ЭФФЕКТЫ ВАУ 11-7082 НА ФОРМИРОВАНИЕ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК *IN VITRO*

© 2019 г. В. В. Курилин^{1*}, Ю. Н. Хантакова^{1,2}, В. П. Терещенко¹,
Е. В. Куликова¹, В. С. Мелентьев¹, И. А. Облеухова¹

*E-mail: 2221910@ngs.ru

¹ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», Новосибирск, Россия;

²ФГАОУ ВО «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», Новосибирск, Россия

Поступила: 04.03.2019. Принята: 19.03.2019

Дендритные клетки (ДК) регулируют иммунные ответы, модулируя Т- и В-клетки в направлении эффекторных или толерогенных ответов. В этом исследовании оценили влияние ВАУ 11-7082 на формирование дендритных клеток мышей линии C57Bl/6 *in vitro* в присутствии рекомбинантного IL-10 или TGF-β. Было показано, что добавление ВАУ 11-7082 в культуру незрелых ДК мышей линии C57Bl/6 не оказывал значительного влияния на экспрессию молекул созревания дендритных клеток (CD80, CD86). При использовании ВАУ 11-7082 в сочетании с IL-10 или TGF-β, снижал экспрессию этих молекул. Совместное культивирование ДК со спленоцитами в присутствии ВАУ 11-7082 и IL-10/TGF-β способствовало дифференцировке регуляторных Т-клеток (CD4⁺CD25^{hi}FoxP3⁺) и не способствовало дифференцировке CD4⁺ Т-клеток, продуцирующих IL-10.

Ключевые слова: дендритные клетки, ВАУ 11-7082, интерлейкин-10, трансформирующий фактор роста бета, Т регуляторные клетки

DOI: 10.31857/S102872210006678-0

Адрес: 630099, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, д.14, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», лаборатория молекулярной иммунологии, Курилин Василий Васильевич. Тел. +8 (383) 222 19 10

E-mail: 2221910@ngs.ru

Авторы:

Курилин В. В., к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», Минобрнауки, Новосибирск, Россия;

Хантакова Ю. Н., к.м.н., научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», Новосибирск, Россия; преподаватель кафедры фундаментальной медицины Института медицины и психологии им. В. Зельмана Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет» (ФГАОУВО НГУ), Новосибирск, Россия;

Терещенко В. П., очный аспирант ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», Новосибирск, Россия;

Куликова Е. В., к.б.н., научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФГБНУ «Научно-исследователь-

ский институт фундаментальной и клинической иммунологии», Новосибирск, Россия;

Мелентьев В. С., очный аспирант ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», Новосибирск, Россия;

Облеухова И. А., к.б.н., научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», Новосибирск, Россия.

АКТУАЛЬНОСТЬ

Иммунная система обеспечивает эффективные защитные реакции против чужеродных патогенов, но не реагирует на аутоантигены, таким образом, сохраняя целостность организма и подерживая иммунологическую толерантность. Этот селективный ответ на антигены зависит от регуляторных механизмов, в том числе регуляторных иммунных клеток (дендритные клетки).

Основная **цель** этого исследования состояла в том, чтобы оценить влияние ВАУ 11-7082 на формирование дендритных клеток с помо-

шью цитокинов IL-10 и TGF- β . Интерес представляет изучение изменения фенотипических и функциональных свойств дендритных клеток, индуцированных в присутствии ключевых иммуносупрессорных цитокинов IL-10 или TGF- β , под воздействием дополнительного фактора подавления клеточной активности – BAY 11-7082 (ингибитор Nf- κ B).

ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ МЕТОДЫ

В эксперименте использовали двухмесячных самок мышей линии C57BL/6 (масса тела 20–25 г). Исследование соответствовало принципам, изложенным в Хельсинкской декларации. Источником получения дендритных клеток был костный мозг. Клетки костного мозга культивировали в «полной» питательной среде RPMI-1640 с добавлением 20 нг/мл gmGM-CSF и 20 нг/мл gmIL-4 в течение 3-х суток. Затем были сформированы экспериментальные группы в зависимости от добавления иммуносупрессорных факторов: BAY 11-7082 (2,5 мкМ), gmIL-10 (10 нг/мл) и gmTGF- β (10 нг/мл). Через 3 дня анализировали фенотип индуцированных ДК методом проточной цитофлуориметрии с использованием соответствующих комбинаций моноклональных антител. Функциональные свойства ДК оценивали путем совместного культивирования с аллогенными спленоцитами в соотношении 1:10 – изменение содержания CD4⁺CD25^{hi}FoxP3⁺ Т-клеток, внутриклеточной экспрессии IL-10 в CD4⁺ Т-лимфоцитах методом проточной цитофлуориметрии и оценка содержания IL-10 в кондиционированной среде с помощью методом ELISA. Пролиферацию спленоцитов оценивали с использованием не-радиоактивного теста PreMix WST-1 в соответ-

ствии с протоколом производителя. Статистический анализ проводился с использованием программного обеспечения GraphPadPrism 6.0. Различия между параметрами считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Было показано, что использование gmIL-10 и gmTGF- β для формирования дендритных клеток, приводило к значительному снижению экспрессию костимулирующих молекул на поверхности CD11c⁺H2-b⁺ ДК. Совместное культивирование спленоцитов и ДК, обработанных gmIL-10 или gmTGF- β , значительно увеличивало частоту CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Т-клеток и продукцию IL-10.

Кроме того, наблюдается снижение пролиферативной активности спленоцитов по сравнению с группой незрелых ДК. Эти результаты свидетельствуют о выраженном влиянии gmIL-10 и gmTGF- β на формировании дендритных клеток, обладающих противовоспалительной активностью на культуру спленоцитов.

Наше исследование показало, что BAY 11-7082 практически не влиял на фенотип и функциональную активность индуцированных ДК у мышей C57Bl/6. Отсутствие ожидаемого супрессорного эффекта BAY 11-7082 можно объяснить участием других транскрипционных путей в индукции созревания ДК. Однако одновременное применение BAY 11-7082 и gmIL-10 или BAY 11-7082 и gmTGF- β для дифференцировки ДК оказывало влияния на экспрессию костимулирующих молекул ДК или толерогенный потенциал совместных культур спленоцитов.

Работа выполнена в рамках проекта РФФ 16-15-00086.

EFFECTS OF BAY 11-7082 ON THE FORMATION OF IMMUNOSUPPRESSOR DENDRITIC CELLS *IN VITRO*

© 2019 V. V. Kurilin^{1*}, Yu. N. Khantakova^{1,2}, V. P. Tereshchenko¹,
E. V. Kulikova¹, V. S. Melentiev¹, I. A. Obleukhova¹

*E-mail: 2221910@ngs.ru

¹Federal State Budgetary Scientific Institution "Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology", Russia, Novosibirsk;

²Novosibirsk State University, Russia, Novosibirsk

Received: 04.03.2019. Accepted: 19.03.2019

Dendritic cells (DCs) regulate immune responses by modulating T and B cells in the direction of effector or tolerogenic responses. In this study, the effect of BAY 11-7082 on the formation of immunosuppressive DC of C57Bl/6 mice *in vitro* using recombinant IL-10 or TGF- β was evaluated. It was shown that the addition of BAY 11-7082 to the culture of immature DCs did not significantly affect the expression of the maturation molecules of dendritic cells (CD80, CD86). When using BAY 11-7082 in combination with IL-10 or TGF- β , reduced the expression of these molecules. The joint cultivation of DC with splenocytes in the presence of BAY 11-7082 and IL-10/TGF- β promoted the differentiation of regulatory T-cells (CD4⁺CD25^{hi}FoxP3⁺) and did not contribute to the differentiation of CD4⁺ T-cells producing IL-10.

Key words: dendritic cells, BAY 11-7082, interleukin-10, transforming growth factor beta, Treg cells

Authors:

Kurilin V. V., ✉ PhD, Senior Researcher of the Laboratory of Molecular Immunology, Federal State Budgetary Scientific Institution "Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology" (RIFCI), Novosibirsk, Russia;

Khantakova Yu.N., PhD, Researcher of the Laboratory of Molecular Immunology, RIFCI, Russia, Novosibirsk; Lecturer, Department of Fundamental Medicine, Institute of Medicine and Psychology V. Zelman of Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia;

Tereshchenko V. P., Ph.D. student of the RIFCI, Novosibirsk, Russia;

Melentiev V. S., Ph.D. student of the RIFCI, Novosibirsk, Russia;

Kulikova E. V., Ph.D., Researcher of the Laboratory of Molecular Immunology, RIFCI, Novosibirsk, Russia;

Obleukhova I. A., Ph.D., Researcher, Laboratory of Molecular Immunology, RIFCI, Novosibirsk, Russia.

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СУБПОПУЛЯЦИОННОГО СОСТАВА ЛИМФОЦИТОВ И БЕЛКА ТЕПЛООВОГО ШОКА У ПАЦИЕНТОВ С ВИБРАЦИОННОЙ БОЛЕЗНЬЮ

© 2019 г. С. И. Курчевенко*, Г. М. Бодиенкова, О. Л. Лахман

*E-mail: immun11@yandex.ru

ФГБНУ «Восточно-Сибирский институт медико-экологических исследований»,
Ангарск, Россия

Поступила: 28.02.2019. Принята: 13.03.2019

Сравнительный анализ субпопуляционного состава лимфоцитов у пациентов с вибрационной болезнью (ВБ) от воздействия локальной вибрации позволил выявить особенности иммунного ответа, характеризующиеся увеличением абсолютного количества CD3⁺-, CD4⁺-, CD8⁺-лимфоцитов и снижением процентного количества CD20⁺-, CD25⁺-лимфоцитов. У пациентов с ВБ от сочетанного воздействия локальной и общей вибрации наблюдалось повышение абсолютного количества CD3⁺-, CD4⁺-, CD8⁺-, CD16⁺-, CD20⁺-, CD25⁺-, CD95⁺-лимфоцитов, что свидетельствует об активации процессов апоптоза лимфоцитов в условиях выраженной стимуляции иммунной системы. Снижение уровня БТШ70 в сыворотке крови у пациентов с ВБ от воздействия локальной вибрации свидетельствует о накоплении его внутри клетки и защите процессов биосинтеза и структурной целостности белков в поврежденной клетке за счет В-лимфоцитов.

Ключевые слова: лимфоциты, белки теплового шока, локальная и общая вибрация, вибрационная болезнь

DOI: 10.31857/S102872210006677-9

Адрес: 665827 Иркутская область, г. Ангарск, 12а микрорайон, д. 3, ГБНУ «Восточно-Сибирский институт медико-экологических исследований». Курчевенко Светлана Ивановна. Тел. 8(3955) 586910, 89246261428 (моб.).

E-mail: immun11@yandex.ru

Авторы:

Курчевенко С. И., к.м.н., научный сотрудник лаборатории иммуно-биохимических и молекулярно-генетических исследований ФГБНУ «Восточно-Сибирский институт медико-экологических исследований» Ангарск, Россия;

Бодиенкова Г. М., д.м.н., профессор, заведующая лабораторией иммуно-биохимических и молекулярно-генетических исследований ФГБНУ «Восточно-Сибирский институт медико-экологических исследований» Ангарск, Россия; профессор кафедры промышленной экологии и безопасности жизнедеятельности ФГБОУ ВО «Иркутский национальный исследовательский технический университет», Иркутск, Россия;

Лахман О. Л., профессор РАН, д.м.н., профессор, директор ФГБНУ «Восточно-Сибирский институт медико-экологических исследований» Ангарск, Россия.

ВВЕДЕНИЕ

Вибрационная болезнь (ВБ) по-прежнему занимает лидирующее положение в структуре

хронических профессиональных заболеваний. Несмотря на многочисленные исследования, остается много неясных вопросов относительно патогенеза и лечения ВБ [1]. В этом отношении участие иммунной системы в обеспечении гомеостаза организма при воздействии вибрационного фактора внешней среды не вызывает сомнений [2]. Поскольку изменения клеток в процессе роста и дифференцировки, старения, естественного отмирания, стресса, воздействия производственных факторов рассматриваются иммунной системой как нарушения клеточного гомеостаза [3]. Важным диагностическим признаком для выявления нарушений функционирования иммунной системы является определение субпопуляционного состава и фенотипа лимфоцитов периферической крови. В то же время результаты различных авторов, касающиеся изменений этих параметров у пациентов с ВБ, достаточно противоречивы. Кроме того, известно, что белки теплового шока (БТШ), действуя на Toll-рецепторы эпителиальных клеток, вызыва-

ют выброс хемокинов, привлекающих в данный регион клетки естественного иммунитета (нейтрофилы, эозинофилы, базофилы, моноциты, тучные клетки, лимфоциты). В результате этого формируется очаг воспаления, который при своевременной терапии может быть ликвидирован, но чаще причина активации Т и В-лимфоцитов остается [4]. В связи с этим, **цель работы** – провести сравнительную оценку субпопуляционного состава лимфоцитов и БТШ70 у пациентов с вибрационной болезнью от воздействия локальной и сочетанного воздействия локальной и общей вибрации.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование включены 54 пациента мужского пола. Диагноз установлен врачами клиники института согласно международной классификации болезней X пересмотра. В первую группу вошли 26 человек с ВБ от воздействия локальной вибрации средний возраст – $49,61 \pm 1,44$ лет, стаж работы в контакте с вибрацией – $19,9 \pm 1,06$ лет. Во вторую – 28 человек с ВБ от сочетанного воздействия локальной и общей вибрации средний возраст – $51,45 \pm 0,87$, стаж работы – $25,5 \pm 2,13$ года. В группу сравнения включены 27 здоровых мужчин, сопоставимых по возрасту ($50,23 \pm 2,04$ года), не контактирующих в процессе трудовой деятельности с вибрацией.

Субпопуляционный состав лимфоцитов крови оценивали с помощью метода непрямой иммунофлуоресцентной микроскопии с использованием моноклональных антител к CD3, CD4, CD8, CD16, CD25, CD95 клеткам (ООО «Сорбент», Москва). Концентрацию БТШ70 в сыворотке крови определяли методом ИФА с использованием ELISA kits HSP70 Assay Design (Enzo LifeScience, США). Статистический анализ результатов проводили, используя пакет прикладных программ «Statistica for Windows» Version 6.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

У пациентов с ВБ от воздействия локальной вибрации состояние Т- и В-клеточного иммунитета сопровождалось повышением абсолютного количества общей популяции Т-лимфоцитов (CD3⁺) ($p=0,001$) за счет фракции Т-хелперов (CD4⁺) ($p=0,044$) и Т-супрессоров (CD8⁺) ($p=0,0005$) и снижением процентного количества В-лимфоцитов (CD20⁺) ($p=0,006$) и экспрессии раннего активационного маркера (CD25⁺) ($p=0,002$). У пациентов с ВБ от сочетанного воз-

действия локальной и общей вибрации наблюдалась выраженная гиперактивация иммунного ответа, которая характеризовалась повышением абсолютного количества общей популяции Т-лимфоцитов ($p=0,001$), Т-хелперов ($p=0,028$), Т-супрессоров ($p=0,0008$), натуральных киллеров ($p=0,001$), В-лимфоцитов ($p=0,005$) и увеличением экспрессии маркеров ранней ($p=0,001$) и поздней ($p=0,019$) активации.

Учитывая, что БТШ могут высвобождаться во внеклеточную среду и в этом случае их особая протективная роль заключается в контроле воспалительного иммунного ответа, нами определено содержание БТШ70 в сыворотке крови у обследованных пациентов и выявлена его зависимость с количеством субпопуляций лимфоцитов. Так, у пациентов с ВБ от локальной вибрации наблюдалось снижение уровня БТШ70 в сыворотке крови до $0,1 (0,04-0,36)$ пг/мл ($p=0,019$), а у пациентов с ВБ от сочетанного воздействия локальной и общей вибрации его уровень оставался в пределах контрольных значений – $0,39 (0,33-0,42)$ пг/мл (в контроле – $0,37 (0,13-0,41)$ пг/мл). При анализе взаимосвязей между содержанием БТШ70 и субпопуляциями лимфоцитов у пациентов с ВБ от локальной вибрации выявлена прямая корреляционная зависимость между уровнем БТШ70 и процентным количеством В-лимфоцитов (CD20⁺) ($r=0,51$; $p=0,009$). У пациентов с ВБ от сочетанного воздействия локальной и общей вибрации статистически значимые корреляции не определялись.

Таким образом, сравнительный анализ субпопуляционного состава лимфоцитов у пациентов с ВБ от воздействия локальной вибрации позволил выявить особенности иммунного ответа, характеризующиеся увеличением абсолютного количества CD3⁺-, CD4⁺-, CD8⁺-лимфоцитов и снижением процентного количества CD20⁺-, CD25⁺-лимфоцитов. В то же время у пациентов с ВБ от сочетанного воздействия локальной и общей вибрации наблюдалось возрастание абсолютного количества CD3⁺-, CD4⁺-, CD8⁺-, CD16⁺-, CD20⁺-, CD25⁺-, CD95⁺-лимфоцитов, что свидетельствует об активации процессов апоптоза лимфоцитов в условиях выраженной стимуляции иммунной системы. Снижение уровня БТШ70 в сыворотке крови у пациентов с ВБ от воздействия локальной вибрации, по видимому, свидетельствует о накоплении его внутри клетки и защите процессов биосинтеза и структурной целостности белков в поврежденной клетке за счет В-лимфоцитов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. *Бабанов С. А., Татаровская Н. А.* Вибрационная болезнь: современное понимание и дифференциальный диагноз. Русский медицинский журнал. Медицинское обозрение. 2013, 21; 35, 1777–1784. [*Babanov S. A., Tatarovskaya N. A.* Vibration disease: modern understanding and differential diagnosis. In: Russian medical journal. Medical Review. 2013, 21; 35, 1777–1784.].
2. *Bodienkova G. M., Kurchevenko S.* The relationship between the cytokine concentrations and levels of antibodies to neuronal proteins in workers who were exposed to vibration. *Neurochemical Journal*. 2016, 33; 1, 85–89.
3. *Потаннев М. П.* Аутофагия, апоптоз, некроз, клеток и иммунное распознавание своего и чужого. Иммунология. 2014, 35; 2, 95–102. [*Potapnev M. P.* Autophagy, apoptosis, necrosis, cell and immune recognition of one's own and someone else's. In: *Immunology*. 2014, 35; 2, 95–102].
4. *Yasuyuki A., Takayoshi J. and Tomohiko O.* Oral Treponemes and their outer membrane extracts activate human gingival epithelial cells through toll like receptor 2. *Infection and Immunity*. 2003, 71; 2, 717–725.

**COMPARATIVE CHARACTERISTICS OF THE SUBPOPULATION
COMPOSITION OF LYMPHOCYTES AND HEAT SHOCK PROTEIN
IN PATIENTS WITH VIBRATION DISEASE**

© 2019 S. I. Kurchevenko*, G. M. Bodienkova, O. L. Lakhman

*E-mail: immun11@yandex.ru

FSBI “East-Siberian Institute of Medical and Ecological Research”, Angarsk, Russia

Received: 28.02.2019. **Accepted:** 13.03.2019

Comparative analysis of the subpopulations of lymphocytes in patients with vibration disease (VB) from the effects of local vibration revealed the features of the immune response, characterized by increasing the absolute amount of CD3⁺-, CD4⁺-, CD8⁺- lymphocytes and decreased the percentage of CD20⁺-, CD25⁺-lymphocytes. In patients with VB from the effects of combined vibration, an increase in the absolute number of CD3⁺-, CD4⁺ -, CD8⁺ -, CD16⁺ -, CD20⁺-, CD25⁺-, CD95⁺-lymphocytes was observed, which indicates the activation of lymphocyte apoptosis under conditions of pronounced stimulation of the immune system. A decrease in the level of HSP70 in the serum of patients with VB from exposure to local vibration indicates its accumulation inside the cell and the protection of the processes of biosynthesis and the structural integrity of proteins in the damaged cell due to B-lymphocytes.

Key words: lymphocytes, heat shock proteins, local and general vibration, vibration disease

Authors:

Kurchevenko S. I., ✉ PhD, Researcher of the laboratories of Immune and biochemical and molecular and genetic research, East-Siberian Institute for Medical and Ecological Research, Angarsk, Russia. **E-mail:** immun11@yandex.ru;

Bodienkova G. M., DMS, Professor, Head of the Laboratories of Immune and biochemical and molecular and genetic research, East-Siberian Institute for Medical and Ecological Research, Angarsk, Russia; Professor, Department of Industrial Ecology and Safety of Vital Functions, Irkutsk National Research Technical University, Irkutsk, Russia;

Lakhman O. L., Professor of the Russian Academy of Sciences, DMS, Professor, Director of the East-Siberian Institute for Medical and Ecological Research, Angarsk, Russia.

РОЛЬ МАКРОФАГОВ В РЕГЕНЕРАЦИИ МЫШЕЧНЫХ ТКАНЕЙ, ИНДУЦИРОВАННЫХ АЛЛОГЕННЫМ БИОМАТЕРИАЛОМ

© 2019 г. А. И. Лебедева^{1,2*}, С. А. Муслимов^{1,2}, С. А. Афанасьев³,
Д. С. Кондратьева³

*E-mail: jeol02@mail.ru

¹ФГБУ «Всероссийский центр глазной и пластической хирургии»
Минздрава России, Уфа, Россия;

²ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет»
Минздрава России, Уфа, Россия;

³ФГБНУ НИИ кардиологии, Томского НИМЦ (Национальный исследовательский
медицинский центр), Томск, Россия

Поступила: 15.03.2019. Принята: 03.04.2019

Аллогенные биоматериалы (АБ) после имплантации в дефект мышцы голени крысы и рог матки крысы способствуют регенерации тканей за счет миграции М1 макрофагов, экспрессирующие провоспалительные факторы – TNF α , IL-1. Они ингибируют миграцию М2 макрофагов, факторов фиброза, способствуют миграции и дифференциации миоцитов. В ишемически поврежденном миокарде после имплантации АБ напротив обнаруживался дефицит макрофагов CD68, но и высокая экспрессия клетками Timp2 по сравнению с контролем, что могло способствовать снижению площади рубца. После введения АБ в мышечных тканях выявлены резидентные макрофаги с фенотипом IL1⁺/CD68⁺/PCNA⁺/Хейл⁺/vimentin⁺/FGF1⁻/TGF- β 1⁻.

Ключевые слова: аллогенный биоматериал, мышечная ткань, макрофаги, регенерация

DOI: 10.31857/S102872210006676-8

Адрес: 450075, Уфа, ул. им. Р. Зорге, д. 67/1, ФГБУ «Всероссийский центр глазной и пластической хирургии» Минздрава России, отдел морфологии, Лебедева Анна Ивановна.
Тел./факс: +7(347) 293 42 35, 8 903 351 02 07 (моб.)

E-mail: Jeol02@mail.ru

Авторы:

Лебедева А. И., д.б.н., ст.н.с. отдела морфологии ФГБУ «Всероссийский центр глазной и пластической хирургии» МЗ РФ, Уфа, Россия; доцент кафедры анатомии человека ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» МЗ РФ, Уфа, Россия;

Муслимов С. А., д.м.н., вед.н.с., зав. отделом морфологии ФГБУ «Всероссийский центр глазной и пластической хирургии» МЗ РФ, Уфа, Россия; доцент кафедры анатомии человека ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» МЗ РФ, Уфа, Россия;

Афанасьев С. А., д.м.н., заведующий лабораторией молекулярно-клеточной патологии и генодиагностики. ФГБНУ НИИ кардиологии, Томского НИМЦ (Национальный исследовательский медицинский центр), Томск, Россия;

Кондратьева Д. С., к.б.н., научный сотрудник лаборатории молекулярно-клеточной патологии и генодиагностики. ФГБНУ НИИ кардиологии, Томского НИМЦ (Национальный исследовательский медицинский центр), Томск, Россия.

Успех регенерации мышечной ткани зависит от фенотипа макрофагов и их секреторной активности, которая носит дуалистический характер.

Целью исследования явилось определение роли макрофагов и их цитокинового спектра при регенерации скелетной, гладкой и сердечной мышечных тканей при имплантации аллогенного биоматериала.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Для исследования регенерации мышечной ткани использовали крыс линии Wistar. В икроножной мышце моделировали субтотальный дефект 3–4 мм, который ушивали викрилом (контроль n=36). В опытной серии (n=36) в аналогичный дефект укладывали аллогенный губчатый биоматериал (АГБ). Для исследования регенерации гладкой мышечной ткани продольный разрез маточного рога крыс производили фокусированным лучом CO₂-лазера. В контроль-

ной группе животных (n=10) дефект ушивали. В опытной группе (n=15) заполняли дефект аллогенным биоматериалом для замещения объемных дефектов. Моделирование инфаркта миокарда осуществляли путем перевязки коронарной артерии. Одновременно в контрольной группе (n=50) вводили физиологический раствор, а в опытной группе (n=50) вводили суспензию диспергированного аллогенного биоматериала (ДАБ) в бассейн стенозированной артерии. Использовали гистологические (окраска гематоксилином/эозином, по Ван Гизону, по Маллори), гистохимические (окраска по Хейлу – выявление гликозаминогликанов (ГАГ)), альциановым синим), иммуногистохимические (CD68, TGF- β 1, TNF α , IL-1 α , PCNA, vimentin, FGF 1, c-kit, GATA-4) и электронно-микроскопические, морфометрические и статистические методы.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Дефект скелетной мышцы в опытной группе замещался мышечной тканью на 98% со всеми структурными элементами. В миометрии рога матки крысы формировался полноценный регенерат в виде разновекторных кластеров лейомиоцитов в окружении тонких соединительнотканых прослоек. В зоне дефектов биоматериал постепенно деградировал, а продукты его резорбции становились хемоаттрактантами для моноцитов/макрофагов в большом количестве и способствовали трансформации в фенотипически зрелые фагоцитарные формы. Пик активности макрофагов совпадал и коррелировал с динамикой экспрессии провоспалительных цитокинов IL-1 и TNF α , что дает основание предполагать развитие провоспалительной M1 фазы активации клеток. Определялись ГАГ позитивные макрофаги. В регенерате наблюдалось низкое содержание TGF- β 1⁺ и FGF-1⁺ клеток, чему способствовал дефицит Vimentin⁺ клеток, что продлеvalo регенерационный период и содействовало индукции всех компонентов мышечной ткани. В контрольной группе численность CD68⁺ была значительно меньше, чем в опытной группе, определялась высокая концентрация TGFb⁺, FGFb⁺, vimentin⁺ клеток, формировался грубоволокнистый рубец. В пролиферативной фазе воспаления выявлялась реакция макрофагов CD68⁺ без признаков трансформации в гигантоклеточные формы со следующими фенотипическими характеристиками: IL-1⁺ /CD68⁺ /PCNA⁺ / Хейл⁺ / vimentin⁺

/FGF1⁻ /TGF- β 1⁻. Подобные макрофаги широко распространены в тканях различных органов: микроглиальные клетки головного мозга производные желточного мешка, гиалоциты стекловидного тела, плацентарные макрофаги и т.д. Можно предположить, что их наличие в зоне регенерации связано с синтезом углеводного компонента внеклеточного матрикса, определяющего зрелость коллагеновых волокон соединительнотканых прослоек, создания гомеостаза в очаге замещения реактивной зоны и играть структурно-информативную роль для клеточных коопераций [1]. В результате заживления в ишемически поврежденном миокарде индекс площади рубца в опытной группе был в 2,74 раза меньше, чем в контрольной. В опытной группе течение воспалительного процесса характеризовалось наступлением ранней пролиферативной стадии. Этому способствовало напротив меньшее количество макрофагов. Наряду с костномозговыми предшественниками макрофагов, также выявлены макрофаги мезенхимного происхождения – Хейл⁺ и Timp-2⁺. Продукты биодеградации ДАБ привлекали стволовые миокардиальные клетки c-kit⁺, которые в 6,24 раза превосходили численность контрольной группы в начальные сроки эксперимента. Несмотря на аутогенное происхождение, они подвергались фагоцитозу макрофагами, что связано с генетически запрограммированным механизмом антитуморогенности. Тем не менее, численность свободных c-kit⁺ клеток в опытной группе превосходила контрольную группу. Подход к модуляции макрофагов заключается в изменении их окружения. Морфофункциональные свойства макрофагов формируются микроокружением органа проживания [2]. Следовательно, ДАБ в условиях острой ишемии миокарда оказывал гистопротекторный эффект за счет ингибирования миграции макрофагов и индукции клеточного кардиомиогенеза.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. *Muldashv E. R., Muslimov S. A., Musina L. A., Nigmatullin R. T., Lebedeva A. I., Shangina O. R., Khasanov R. A.* The role of macrophages in the tissues regeneration stimulated by the biomaterials. *Cell Tissue Bank.* 2005; 6(2): 99–107.
2. *Lavine K. J., Epelman S., Uchida K., Weber K. J., Nichols C. G., Schilling J. D., Ornitz D. M., Randolph G. J., Mann D. L.* Distinct macrophage lineages contribute to disparate patterns of cardiac recovery and remodeling in the neonatal and adult heart. *PNAS.* 2014. 111 (45):16029–16034.

THE ROLE OF MACROPHAGES IN REGENERATION OF MUSCLE TISSUE INDUCED BY ALLOGENIC BIOMATERIAL

© 2019 A. I. Lebedeva^{1,2*}, S. A. Muslimov^{1,2}, S. A. Afanasiev³,
D. S. Kondratieva³

*E-mail: jeol02@mail.ru

¹Federal State Budgetary Institution «The Russian Eye and Plastic Surgery Centre»
of the Russian Federation Health Ministry, Ufa, Russia;

²Federal State Budgetary Education Institution «Bashkir State Medical University»
of the Russian Federation Health Ministry, Ufa, Russia;

³Federal State Budgetary Research Institute of Cardiology, Tomsk National Research
Medical Centre, Tomsk, Russia

Received: 15.03.2019. Accepted: 03.04.2019

Allogeneic biomaterials (AB) after implantation in a defect in the calf muscles of rats and the uterine horn of the rat contribute to the regeneration of tissues due to migration of M1 macrophages expressing Pro-inflammatory factors, TNF α , IL-1. They inhibit the migration of M2 macrophages, fibrosis factors, promote migration and differentiation of myocytes. IN ischemic damaged myocardium after AB implantation, on the contrary, cd68 macrophage deficiency was found, but high expression by Timp2 cells compared to the control, which could contribute to the reduction of scar area. After the introduction of AB in muscle tissues revealed resident macrophages with phenotype IL-1⁺/CD68⁺/PCNA⁺/Hale⁺/vimentin⁺/FGF1⁻/TGF- β 1⁻.

Key words: allogeneic biomaterial, muscle tissue, macrophages, regeneration

Authors:

Lebedeva A. I., ✉ BD, PhD, senior research assistant of the Department of morphology, FSBI «The Russian Eye and Plastic Surgery Centre» of the RF Health Ministry, FSB Education Institution «Bashkir State Medical University» of the RF Health Ministry, Ufa, Russia. E-mail: jeol02@mail.ru;

Muslimov S. A., MD, PhD, Prof., FSBI «The Russian Eye and Plastic Surgery Centre» of the RF Health Ministry, FSB Education Institution «Bashkir State Medical University» of the RF Health Ministry, Ufa, Russia;

Afanasiev S. A., MD, PhD, Prof. FSBR Institute of Cardiology, Tomsk National Research Medical Centre, Tomsk, Russia;

Kondratieva D. S., PhD in Biology, research associate, FSBR Institute of Cardiology, Tomsk National Research Medical Centre, Tomsk, Russia.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МОДЕЛЬ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ МЕХАНИЗМА НЕЗАВИСИМОЙ ОТ ЛИМФОЦИТОВ ПОЛЯРИЗАЦИИ МАКРОФАГОВ В КИШЕЧНИКЕ МЫШЕЙ

© 2019 г. Е. А. Литвинова^{1,2*}, К. М. Ачасова^{2,1}

*E-mail: dimkit@mail.ru

¹ФГБУН «Сибирский федеральный научный центр агробиотехнологий РАН»,
Новосибирск, Россия;

²ФГБУН «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии
и генетики СО РАН», Новосибирск, Россия

Поступила: 14.03.2019. Принята: 26.03.2019

Острый воспалительный процесс начинается с классического пути активации макрофагов. При хронической форме заболевания организм запускает адаптивный альтернативный путь активации М2-макрофагов. Например, при воспалительном заболевании кишечника (ВЗК) в хронической форме увеличивается количество М2-макрофагов в тканях кишечника. Мы создали модель мышей, у которых отсутствуют зрелые лимфоциты и эти животные склонны к развитию ВЗК из-за отсутствия мукозального барьера в кишке. В результате мы получили хорошую модель, которая раскрывает роль макрофагов и лимфоцитов в развитии ВЗК, а также может быть использована для понимания действия фармакологических препаратов, вызывающих поляризацию макрофагов.

Ключевые слова: макрофаг, лимфоцит, мукозальный иммунитет

DOI: 10.31857/S102872210006651-1

Адрес: 633501, Новосибирская область, п. Краснообск, ул. Центральная, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Сибирский федеральный научный центр агробиотехнологий РАН» (СФНЦА РАН), лаборатории регуляции микробиоценозов сельскохозяйственных животных и растений, Литвинова Екатерина Анатольевна. Тел. 8 923 147 94 64 (моб.)

E-mail: dimkit@mail.ru

Авторы:

Литвинова Е. А., с.н.с. лаборатории генетики лабораторных животных, ФГБУН «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН», Новосибирск, Россия; в.н.с. лаборатории регуляции микробиоценозов сельскохозяйственных животных и растений, ФГБУН «Сибирский федеральный научный центр агробиотехнологий РАН», Новосибирск, Россия;

Ачасова К. М., аспирант лаборатории генетики лабораторных животных, ФГБУН «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН», Новосибирск, Россия; м.н.с. лаборатории регуляции микробиоценозов сельскохозяйственных животных и растений, ФГБУН «Сибирский федеральный научный центр агробиотехнологий РАН», Новосибирск, Россия.

Как бактериальные, так и неинфекционные заболевания начинаются с активации врожденного иммунитета, при котором происходит наработка провоспалительных цитокинов и ак-

тивация макрофагов по классическому пути – М1-тип. Они нарабатывают активные формы кислорода, включая NO, которые способствуют элиминации инфекции и поврежденных/зараженных клеток. Однако длительное воздействие М1-типа макрофагов может быть губительными для клеток хозяина. Поэтому происходит адаптация организма, которая переключает иммунитет на альтернативный путь. Макрофаги, поляризованные по М2 пути, обеспечивают наработку антител, регенерацию тканей и снижают количество воспалительных факторов [1]. Такие формы адаптации иммунитета встречаются как правило при хронических заболеваниях. В последние годы очень актуален поиск веществ способных переключать поляризацию макрофагов с одного на другой тип в качестве терапии различных заболеваний [2]. Из механизма пока известно, что процесс сопряжен с активацией разных типов Т-хелперных лимфоцитов [1]. Происходит ли раньше активация лимфоцитов или поляризация макрофагов пока не известно, так же как до сих пор не понятно могут ли эти процессы быть независимыми. Опубликовано лишь немного

исследований, в которых на конкретных моделях заболеваний показано, что поляризация макрофагов не зависит от лимфоцитов [3].

Экспериментальная модель воспалительного заболевания кишечника (ВЗК) — мыши с нулевой мутацией гена *Muc2*, основного протеогликана вовлеченного в барьерный иммунитет. На ней мы определили, что уже в возрасте 2-х недель наблюдается поляризация макрофагов по М2 типу (хроническая форма ВЗК). Чтобы понять происходит ли такая поляризация за счет включения Т-хелперных лимфоцитов 2-го типа или независимо мы создали модель, у которой помимо отсутствия гена *Muc2* есть однонуклеотидная мутация SCID в гене *Prkdc*. Отсутствие каталитической субъединицы ДНК-зависимой протеинкиназы препятствует созреванию лимфоцитов, в связи с этим у мышей нет зрелых лимфоцитов. Это удобная модель для изучения роли лимфоцитов в различных патологических процессах. В настоящее время до сих пор не изучен вклад лимфоцитов в развитие хронической формы ВЗК у мышей с нарушенной барьерной функцией.

Целью нашей работы было определить роль лимфоцитов в поляризации макрофагов при развитии хронической формы ВЗК у таких мышей.

В данной работе путем скрещивания мышей с нокаутом гена *Muc2* (*Muc2*^{-/-}) и *Prkdc*^{SCID} были получены нужные генотипы, включая нашу экспериментальную модель. В рамках выполнения генотипирования мы усовершенствовали ранее опубликованный метод идентификации мутации SCID с помощью анализа ПЦР в реальном времени. В возрасте 14, 21, 28 дней полученных животных четырех генотипов: *Muc2*^{-/-Prkdc}^{SCID}, *Muc2*^{-/-}, *Prkdc*^{SCID} и WT (дикий тип), — сравнили по уровню экспрессии генов *Arg1* (М2-тип) и *Nos2* (М1-тип), гиперплазии крипт нисходящего отдела толстой кишки и количеству макрофагов. Исследование выполнено в ЦКП «Центр генетических ресурсов лабораторных животных» ФИЦ ИЦиГ СО РАН. В исследовании использовали мышей свободных от специфических патогенов (расширенный список FELASA 2014). На гистологических срезах не было выявлено признаков острого воспаления, таких как отек и эрозия эпителия в нисходящем отделе толстой кишки у мышей всех четырех генотипов. Однако, у мышей *Muc2*^{-/-} и *Muc2*^{-/-Prkdc}^{SCID} была отмечена гиперплазия крипт и больше макрофагов, чем у *Prkdc*^{SCID} и WT только в возрасте 28 дней. Подобные признаки хронического протекания заболевания ВЗК были

показаны на других экспериментальных моделях животных, а также у пациентов с ВЗК.

Известно, что на начальной стадии любого воспаления повышается уровень индуцированной NO-синтетазы (*Nos2*), который неизбежно влечет повышение свободных радикалов. И действительно, количество mRNA генов *Nos2* увеличивалось у мышей *Muc2*^{-/-} и *Muc2*^{-/-Prkdc}^{SCID} уже в 14 дней. В другие возрастные периоды экспрессия *Nos2* повышалась только у *Muc2*^{-/-Prkdc}^{SCID}, тогда как у *Muc2*^{-/-} мышей активность этого гена снижалась до уровня контрольных генотипов *Prkdc*^{SCID} и WT. Отсутствие снижения уровня экспрессии *Nos2* может быть губительным для организма. И, действительно, такие животные уже на стадии 2 месяцев демонстрировали клинические признаки колита, такие как пролапс и довольно раннюю смертность, по сравнению с *Muc2*^{-/-} мышами. Таким образом, можно предположить, что наличие лимфоцитов у *Muc2*^{-/-} мышей подавляют активность и поляризацию макрофагов по М1 типу, вызванную недостатком барьерного иммунитета. Такое снижение активности М1 макрофагов благоприятно сказывается на состоянии организма.

На стадии хронического воспаления происходит поляризация макрофагов с М1 на М2 тип. Макрофаги М2 типа активно синтезируют аргиназу 1, которая катализирует распад L-аргинина до орнитина и мочевины. В свою очередь орнитин дальше метаболизируется в полиамины, которые запускают процесс деления клеток и репарацию. У мышей с нарушенной барьерной функцией *Muc2*^{-/-} и *Muc2*^{-/-Prkdc}^{SCID} в возрасте 14 дней повышается экспрессия гена *Arg1*. Но наиболее значимое увеличение количества мРНК происходит только к 28-ми дням у этих генотипов. Значительный подъем макрофагального метаболита сопряжен с увеличением количества клеток в крипте к этому возрасту, что может быть причиной повышения концентрации полиаминов в ткани толстой кишки. Так как увеличение экспрессии маркера макрофагов М2-типа происходит одинаково у мышей двух генотипов *Muc2*^{-/-} и *Muc2*^{-/-Prkdc}^{SCID}, то можно предположить, что оно не зависит от наличия зрелых лимфоцитов.

Полученная нами модель животных с нарушенной барьерной функцией и отсутствием зрелых лимфоцитом может быть хорошим объектом для изучения эффекта фармакологических препаратов участвующих в реполяризации макрофагов или в снижении их активности без участия зрелых лимфоцитов. Это позволит де-

тально понять механизм действия таких препаратов.

Исследование поддержано бюджетным проектом № 0533-2019-0003. Приобретение реактивов осуществлено за счет гранта РФФИ 18-015-00329.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ/REFERENCES

1. *Martinez F. O., Gordon S.* The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. // F1000Prime Rep.— 2014.—V.6.—P. 13. doi:10.12703/P6-13.
2. *Goswami K. K., Sarkar M., Ghosh S., Saha A., Ghosh T., Guha I., Barik S., Banerjee S., Roy S., Bose A., Dasgupta P., Baral R.* Neem leaf glycoprotein regulates function of tumor associated M2 macrophages in hypoxic tumor core: Critical role of IL-10/STAT3 signaling. // *Molecular Immunology*.—2016.—V.80.—P. 1–10. doi: 10.1016/j.molimm.2016.10.008.
3. *Mills C. D., Ley K. J.* M1 and M2 macrophages: the chicken and the egg of immunity. // *Innate Immun.*— 2014.—V6(6).—P. 716–726. doi: 10.1159/000364945.

EXPERIMENTAL MODEL FOR THE STUDY OF A INDEPENDENT FROM THE LYMPHOCYTES OF POLARIZATION INTESTINAL MACROPHAGES IN THE MICE

© 2019 E. A. Litvinova^{1,2}, K. M. Achasova^{2,1}

*E-mail: dimkit@mail.ru

¹Siberian Federal Scientific Centre of Agro-BioTechnologies of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia;

²The Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

Received: 14.03.2019. Accepted: 26.03.2019

Acute inflammatory begins to activate of M1-macrophage by classical pathway. In the chronic form of the disease, the body triggers an adaptive alternative pathway to activate of M2-macrophages. For example, the number of intestinal M2-macrophages increases in inflammatory bowel disease (IBD) of a chronic form. We have got a model of mice that do not have mature lymphocytes and these animals development of IBD due to the absence of a intestinal mucosal barrier. We obtained a good model that reveals the role of macrophages and lymphocytes in the development of IBD, and can also be used to understand the effect of pharmacological drugs that cause polarization of macrophages.

Key words: macrophage, lymphocyte, mucosal immunity

Authors:

Litvinova E. A., ✉ leading researcher in the laboratory for regulation of agricultural animals and plants microbiocenosis, Siberian Federal Scientific Centre of Agro-BioTechnologies RAS, Novosibirsk; senior researcher in the laboratory of genetics of laboratory animals, The Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics, SBRAS, Novosibirsk, Russia. **E-mail:** dimkit@mail.ru;
Achasova K. M., PhD student in the laboratory of genetics of laboratory animals, The Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics SBRAS, Novosibirsk; junior researcher in the laboratory for regulation of agricultural animals and plants microbiocenosis, Siberian Federal Scientific Centre of Agro-BioTechnologies RAS, Novosibirsk, Russia.

СТЕАРИЛАМИН ВЫЗЫВАЕТ БЫСТРОЕ ОБРАЗОВАНИЕ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ЛОВУШЕК (НЕТОЗ), НЕ ЗАВИСЯЩЕЕ ОТ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА

© 2019 г. Н. Ю. Лотош^{1*}, А. А. Селищева^{1,2}, Н. В. Воробьева²

* E-mail: natalotosh@gmail.com

¹ФГБУ НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Россия;

²ФГБОУ ВО МГУ им. М. В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, Россия

Поступила: 15.03.2019. Принята: 27.03.2019

Методом конфокальной флуоресцентной микроскопии было показано, что стеариламин (СА) в концентрации 0,2 мг/мл вызывает образование нейтрофильных внеклеточных ловушек. По сравнению с форболовым эфиром мирилата ацетата (ФМА) — классическим активатором нетоза — при воздействии СА этот процесс протекает быстрее (30–60 мин), тогда как при действии ФМА за 2–3 часа. С помощью люминол-зависимой хемилюминесценции (ХЛ) было показано, что СА не активирует НАДФН-оксидазу. СА дозозависимо подавляет кислородный взрыв (КВ) клеток, стимулированных ФМА, зимозаном и латексом. Прямое доказательство того, что активные формы кислорода (АФК) не требуются в нетозе, было получено на примере нейтрофилов, выделенных из крови пациентов с хронической гранулематозной болезнью (ХГБ). Из результатов следует, что образование нейтрофильных внеклеточных ловушек под действием СА протекает по неклассическому механизму.

Ключевые слова: конфокальная флуоресцентная микроскопия, люминол-зависимая хемилюминесценция, нейтрофильные внеклеточные ловушки, нетоз, стеариламин

DOI: 10.31857/S102872210006650-0

Адрес: 123098 Москва, пл. Академика Курчатова, 1. НИЦ «Курчатовский институт», Лотош Наталья Юрьевна.

Тел: +7 (916) 456-16-89

E-mail: natalotosh@gmail.com

Авторы:

Лотош Н. Ю., к.х.н., научный сотрудник Отдела биотехнологий и биоэнергетики ФГБУ НИЦ «Курчатовского института», Москва, Россия;

Селищева А. А., д.х.н., инженер-исследователь ФГБУ НИЦ «Курчатовский институт», ведущий научный сотрудник ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова», Москва, Россия;

Воробьева Н. В., к.б.н., старший научный сотрудник ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова», Москва, Россия.

ВВЕДЕНИЕ

Нетоз — защитный механизм, при котором нейтрофилы выбрасывают содержимое ядра и гранул во внеклеточную среду. Наряду с этим активируется НАДФН-оксидаза и вырабатываются АФК. В результате образуются нейтрофильные внеклеточные ловушки, которые видны как длинные нити ДНК или облакопо-

добные структуры [1]. Для изучения нетоза *in vitro* обычно используют форболовый эфир ацетата мирилата (ФМА). При стимуляции клеток ФМА нетоз развивается по пути, который считается классическим [2]. В этом случае выработка АФК — неперенное условие для развития нетоза, однако роль АФК до конца не выяснена. Другой характерный признак «классического» нетоза — это длительность процесса 2–3 часа. В последнее время появились сообщения о нетозе, развитие которого отличается от классического: АФК-независимый быстрый нетоз [3].

Ранее нами было изучено влияние катионных липосом, состоящих из фосфатидилхолина (ФХ) и содержащих стеариламин (ФХ-СА липосомы), на формирование нейтрофильных внеклеточных ловушек и КВ. Показали, что инкубация нейтрофилов с ФХ-СА липосомами приводит к быстрому нетозу [4]. Оценка АФК с помощью люминол-зависимой ХЛ показала, что липосомы из ФХ, так же как и ФХ-СА липосомы, могли вызывать КВ через 2–3 часа после

их добавления к клеткам, что, возможно, обусловлено принесенным ФХ или липидными радикалами, а не непосредственно СА. Стоит отметить, что пустые ФХ-липосомы не вызывали нетоз. ФХ-СА липосомы вызывали нетоз гораздо раньше, чем происходил КВ. Чтобы однозначно ответить на вопрос о необходимости АФК для нетоза и исключить влияние ФХ, в данной работе использовали СА, растворенный в ДМСО. Чтобы оценить возможность участия длинноцепочечных жирных кислот в развитии нетоза, в качестве контроля использовали стеариновую кислоту (С18).

МЕТОДЫ

Выделение нейтрофилов. Нейтрофилы выделяли из венозной крови в градиенте плотности фикола.

Флуоресцентная микроскопия. Нейтрофильные внеклеточные ловушки визуализировали с помощью флуоресцентного конфокального микроскопа FluoView Olympus 10i (Япония). Нейтрофилы культивировали при 37 °С в присутствии 0.2 мг/мл СА или С18, или 40 нМ ФМА (во всех образцах содержание ДМСО 2%), фиксировали метанолом и окрашивали акридиновым оранжевым.

Кислородный взрыв нейтрофилов оценивали методом люминол-зависимой ХЛ с помощью хемилюминометра Lum-1200 (ДИСофт, Россия). Нейтрофилы инкубировали с 0.2; 0.04 и 0.008 мг/мл СА 15 мин при 37 °С и стимулировали ФМА (40 нМ), зимозаном (0.1 мг/мл) или латексом (размер частиц 1.2 мкм).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Образование нейтрофильных внеклеточных ловушек. Были проанализированы образцы нейтрофилов, полученных от пяти добровольцев. Установили, что инкубация нейтрофилов с СА вызывает нетоз. Наблюдала как «миксы» ядра и цитоплазмы, так и сами ловушки (нити или облака). Поскольку нетоз, вызываемый ФМА, подробно описан в литературе, время образования ловушек при инкубации с СА сравнивали со временем их образования под влиянием ФМА. Во всех случаях происходило быстрое образование ловушек. В одних случаях клетки начинали образовывать ловушки уже через 30 мин после инкубации с СА, а через час 100% клеток были подвержены нетозу. В других случаях ловушки начинали образовываться через час, но

уже через 90 мин все клетки были задействованы в процессе. ФМА активировал ловушки гораздо позднее – через 120–180 мин, причем процент нетотических клеток никогда не достигал 100%.

Сравнительно недавно было установлено, что на поверхности нейтрофилов локализованы рецепторы жирных кислот. Чтобы оценить возможность участия остатков жирных кислот в индукции нетоза, нами было исследовано действие С18 на нейтрофилы. Мы показали, что инкубация С18 с нейтрофилами сопровождалась образованием немногочисленных ловушек, процент которых не превышал 10.

Отдельно стоит отметить результаты эксперимента с нейтрофилами, выделенными от пациентов с ХГБ. При этом заболевании нарушена функция НАДФН оксидазы, и нейтрофилы не способны генерировать АФК. В этом случае ФМА не вызывает нетоз. Оказалось, что СА способен вызывать нетоз таких клеток: через 60 мин нетоз развивался у 50% клеток больного ХГБ, а через 120 мин – практически у всех клеток.

Кислородный взрыв нейтрофилов. СА оказывал дозозависимое ингибирующее действие на КВ: в концентрации 0.2 мг/мл СА полностью подавлял генерацию АФК клетками, стимулированными ФМА, зимозаном и латексом. Меньшие концентрации СА (0.04 и 0.008 мг/мл) такого действия не оказывали. Кроме того, стоит отметить, что сам по себе СА не вызывал активацию НАДФН-оксидазы, поскольку при стимулировании клеток в течение трех часов пика ХЛ не наблюдали.

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящее время исследования нетоза показали, что существуют как минимум два типа этого процесса. Один, активируемый ФМА и другими химическими и микробными факторами, развивается в течение 2–3 ч, причем для этого процесса необходимы АФК, роль которых не выяснена окончательно. Другой тип нетоза (неклассический) развивается значительно быстрее (30–60 мин) и не зависит от АФК. Этот тип нетоза описан для таких активаторов как внутриклеточные паразиты и стафилококк [3, 5].

В данной работе показано, что СА, положительно заряженный амин, содержащий 18 углеродных атомов, вызывает быстрый нетоз без участия АФК. Более того, СА дозозависимо блокирует КВ, вызванный ФМА, зимозаном и латексом. Известно, что они действуют по разным механизмам: ФМА стимулирует протеинкина-

зу С, вызывая активацию НАДФН-оксидазы, а зимозан и латекс индуцируют фагоцитоз. Интересно отметить, что отрицательно заряженная жирная кислота С18 почти не вызывает образование ловушек. Эти результаты и литературные данные по активирующему действию катионных липосом говорят о важной роли положительного заряда на молекуле активатора.

Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что положительно заряженный СА вызывает нетоз, протекающий по механизму, не требующему АФК. Прямое доказательство этого было получено при изучении действия СА на нейтрофилах пациентов с ХГБ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Воробьева Н. В., Пинегин Б. В. Нейтрофильные внеклеточные ловушки: механизмы образования, роль в норме и при патологии. Биохимия. 2014, 79 (12), 1580–1591. [Vorobjeva N. V., Pinigin B. V. Neutrophil extracellular traps: mechanisms of formation and role in health and disease. Biochemistry. 2014, 79 (12), 1286–1580].
2. Fuchs T. A., Abed U., Goosmann C., Hurwitz R., Schulze I., Wahn V., Weinrauch Y., Brinkmann V., Zychlinsky A. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. J. Cell Biol, 2007, 176, 231–241.
3. Pilszczek F. H., Salina D., Poon K. K., Fahey C., Yipp B. G., Sibley C. D., Robbins S. M., Green F. H., Surette M. G., Sugai M., Bowden M. G., Hussain M., Zhang K., Kubes P. J. A novel mechanism of rapid nuclear neutrophil extracellular trap formation in response to Staphylococcus aureus. J. Immunol., 2010, 185, 7413–7425.
4. Ломош Н. Ю., Аляева С. О., Василов П. Г., Селищева А. А. Стеариламин вызывает образование нейтрофильных внеклеточных ловушек независимо от активных форм кислорода. Цитология, 2019, 61(4), 1–10. [N. Y. Lotosh, S. O. Alyaseva, R. G. Vasilov, A. A. Selischeva. Stearylamine induces ros-independent neutrophil extracellular traps. Tsitologiya, 2019, 61(4), 1–10].
5. Díaz-Godínez C., Fonseca Z., Néquiz M., Lacleste J. P., Rosales C., Carrero J. C. Entamoeba histolytica Trophozoites induce a rapid non-classical NETosis. Mechanism independent of NOX2-derived reactive oxygen species and PAD4 activity. Front. Cell. Infect. Microbiol., 2018, 8, 184.

STEARYLAMINE ACTIVATES RAPID AND ROS-INDEPENDENT FORMATION OF NEUTROPHIL EXTRACELLULAR TRAPS (NETOSIS)

© 2019 N. Y. Lotosh^{1*}, A. A. Selischeva^{1,2}, N. V. Vorobjeva²

*E-mail: natalotosh@gmail.com

¹National Research Center «Kurchatov Institute», Moscow, Russia

²Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, Moscow, Russia

Received: 15.03.2019. Accepted: 27.03.2019

Using confocal fluorescence microscopy it was shown that stearylamine (SA) at concentration of 0.2 mg/ml causes the neutrophil extracellular traps formation. In comparison with classic NET activator, the phorbol ether of myristate acetate (PMA), SA activates this process much faster, in 30–60 min, while under PMA stimulation it occurs in 2–3 hours. Using luminol-dependent chemiluminescence, we showed that SA does not activate NADPH oxidase. SA dose-dependently suppresses the oxidative burst stimulated with PMA, zymosan, or latex. The direct evidence that NADPH oxidase is not activated under the SA action was obtained by using neutrophils isolated from the blood of patients with chronic granulomatous disease (CGD). It is obvious from our results, that SA-induced NET formation does not require the participation of reactive oxygen species and proceeds according to a nonclassical mechanism.

Key words: fluorescence confocal microscopy, luminol-dependent chemiluminescence, NETosis, neutrophil extracellular traps, stearylamine

Authors:

Lotosh N. Y., Ph.D., Research Associate, Department of Biotechnology and Bioenergy, Kurchatov Institute, Moscow, Russia. E-mail: natalotosh@gmail.com;

Selischeva A. A., Doctor of Chemical Sciences, Research Engineer, Kurchatov Institute Research Center; Leading Research Associate, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia;

Vorobjeva N. V., Ph.D., Senior Research Associate, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia.

СИНЕРГИЧЕСКОЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ РЕЦЕПТОРОВ NOD1 И TLR4 ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА

© 2019 г. Н. Е. Муругина¹, А. С. Будихина¹, П. В. Максимчик²,
Ю. А. Дагиль¹, Л. С. Балясова¹, В. В. Муругин¹, Г. З. Чкадуа³,
Б. В. Пинегин¹, М. В. Пашенков^{1*}

*E-mail: mvpashenkov@yandex.ru

¹ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, Москва, Россия;

²Московский Государственный Университет им. М. В. Ломоносова,
Факультет фундаментальной медицины, Москва, Россия;

³ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России, Москва, Россия

Поступила: 28.02.2019. Принята: 12.03.2019

Впервые проведено комплексное изучение экспрессии цитокинов и метаболического репрограммирования макрофагов при сочетанной стимуляции рецепторов NOD1 и TLR4 врожденного иммунитета. Агонисты NOD1 и TLR4 стимулировали основные параметры гликолиза (скорость закисления внеклеточной среды, потребление глюкозы, высвобождение лактата), однако изменения этих показателей при сочетанной стимуляции не превышали сумму изменений при отдельной стимуляции. В то же время при сочетанной стимуляции наблюдалось синергическое увеличение продукции провоспалительных цитокинов и экспрессии их мРНК на сравнительно поздних сроках (4–9 ч) после добавления агонистов. Таким образом, метаболическая перестройка может поддерживать синергическое увеличение синтеза цитокинов при сочетанной стимуляции NOD1 и TLR4, однако первопричина синергизма заключается в синергическом увеличении экспрессии генов цитокинов.

Ключевые слова: макрофаги, мурамилпептиды, метаболическое репрограммирование, гликолиз, NOD1, TLR4, цитокины

DOI: 10.31857/S102872210006649-8

Адрес: 115522 Москва, Каширское шоссе, д. 24, ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, лаборатория клинической иммунологии. Пашенков Михаил Владимирович.
Тел: +7 (499) 617 76 49, +7 (909) 930 17 70
E-mail: mvpashenkov@yandex.ru

Авторы:

Муругина Н. Е., м.н.с. лаборатории клинической иммунологии ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, Москва, Россия;

Будихина А. С., к.м.н., научный сотрудник лаборатории клинической иммунологии ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, Москва, Россия;

Максимчик П. В., к.м.н., научный сотрудник лаборатории изучения механизмов апоптоза, Факультет фундаментальной медицины, Московский Государственный Университет им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия;

Дагиль Ю. А., научный сотрудник целевой поисковой лаборатории иммунологии Фонда перспективных исследований ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, Москва, Россия;

Балясова Л. С., м.н.с. лаборатории клинической иммунологии ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, Москва, Россия;

Муругин В. В., к.м.н., научный сотрудник лаборатории клинической иммунологии ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, Москва, Россия;

Чкадуа Г. З., к.м.н., с.н.с. лаборатории экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей, ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России, Москва, Россия;

Пинегин Б. В., д.м.н., профессор, заведующий отделом иммунодиагностики и иммунокоррекции ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, Москва, Россия;

Пашенков М. В., д.м.н., и.о. заведующего лабораторией клинической иммунологии ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, Москва, Россия.

NOD-подобные рецепторы (NOD1, NOD2) и Toll-подобные рецепторы (TLR) взаимодействуют синергически: цитокиновый ответ клеток на сочетанную стимуляцию двух рецепторов выше, чем сумма ответов на стимуляцию каждого рецептора по отдельности [1–3]. Полагают, что синергическое усиление продукции провос-

палительных цитокинов играет роль в развитии гипервоспалительного синдрома при сепсисе. С другой стороны, явление синергизма может быть использовано в терапевтических целях при создании иммуностимуляторов, содержащих малые дозы синергически действующих активаторов врожденного иммунитета [1].

Однако механизмы синергического взаимодействия NOD-TLR изучены плохо. Важное значение в физиологии клеток иммунной системы придается метаболическому репрограммированию, в первую очередь переходу активированной клетки с окислительного фосфорилирования на аэробный гликолиз [4], который поставляет энергию и метаболиты для анаболических процессов.

Целью исследования было оценить вклад транскрипции генов цитокинов и изменений метаболизма глюкозы в механизмы синергического взаимодействия рецепторов NOD1 и TLR4 в клетках врожденной иммунной системы человека. В качестве модели использовали макрофаги, полученные путем культивирования моноцитов крови доноров с ГМ-КСФ.

При анализе экспрессии цитокинов обнаружилось, что в ранние сроки после начала стимуляции (1 ч для уровней мРНК TNF, IL-6 и IL-1 β , 2–3 ч для секретированного TNF) имеет место простая суммация эффектов агонистов NOD1 (М-триДАП) и TLR4 (ЛПС), однако на более поздних сроках (4 ч и более) наблюдается выраженное синергическое увеличение секреции TNF и экспрессии мРНК TNF, IL-6 и IL-1 β . Агонисты NOD1 и TLR4 по отдельности стимулировали гликолиз, что проявлялось в повышении скорости закисления среды (в реальном времени), 24-часового потребления глюкозы и 24-часового высвобождения лактата. При стимуляции двумя агонистами наблюдалась суммация

их эффектов либо инфрааддитивные эффекты, синергическое действие на гликолиз отсутствовало. Также не было выявлено синергического влияния агонистов на активацию (фосфорилирование) ряда белков, участвующих в регуляции гликолиза и белкового обмена (киназы Akt, p70, p38, ERK, MNK, фактор инициации трансляции eIF4E). Полученные данные показывают, что события, приводящие к синергическому усилению выработки цитокинов при сочетанной стимуляции NOD1 и TLR4, происходят на уровне транскрипции мРНК цитокинов между 1 и 4 ч после добавления агонистов. Изменения метаболизма глюкозы при сочетанной стимуляции не являются синергическими, однако могут способствовать реализации транскрипционной программы клетки.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. *Tukhvatulin A. I., Gitlin I. I., Shcheblyakov D. V., Artemicheva N. M., Burdelya L. G., Shmarov M. M., Naroditsky B. S., Gudkov A. V., Gintsburg A. L., Logunov D. Y.* Combined stimulation of Toll-like receptor 5 and NOD1 strongly potentiates activity of NF-kappaB, resulting in enhanced innate immune reactions and resistance to *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection. *Infect Immun.* 2013, 81 (10), 3855–64.
2. *Van Heel D. A., Ghosh S., Butler M., Hunt K., Foxwell B. M. G., Mengin-Lecreulx D., Playford R. J.* Synergistic enhancement of Toll-like receptor responses by NOD1 activation. *Eur J Immunol.* 2005, 35, 2471–2476
3. *Fritz J. H., Girardin S. E., Fitting C., Werts C., Mengin-Lecreulx D., Caroff M., Cavillon J.-M., Philpott D. J. and Adib-Conquy M.* Synergistic stimulation of human monocytes and dendritic cells by Toll-like receptor 4 and NOD1- and NOD2-activating agonists. *Eur J Immunol.* 2005, 35 (8), 2459–70.
4. *O'Neill L. A., Pearce E. J.* Immunometabolism governs dendritic cell and macrophage function. *J Exp Med* 2015, 213, 15–23.

SYNERGISTIC INTERACTIONS OF NOD1 AND TLR4 RECEPTORS OF INNATE IMMUNITY

© 2019 N. E. Murugina¹, A. S. Budikhina¹, P. V. Maximchik²,
Y. A. Dagil¹, L. S. Balyasova¹, V. V. Murugin¹, G. Z. Chkadua³,
B. V. Pinegin¹, M. V. Pashenkov^{1*}

*E-mail: mvpashenkov@yandex.ru

¹National Research Center "Institute of Immunology" of the Federal Medical-Biological Agency of Russia, Moscow, Russia;

²Lomonosov Moscow State University, Faculty of Fundamental Medicine, Moscow, Russia;

³FSBI "N. N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology", Laboratory of experimental diagnostics and biotherapy of tumors, of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

Received: 28.02.2019. Accepted: 12.03.2019

We performed a simultaneous analysis of cytokine expression and metabolic reprogramming of macrophages upon combined stimulation of NOD1 and TLR4 receptors of innate immunity. NOD1 and TLR4 agonists boosted main parameters of glycolysis (extracellular acidification rate, glucose consumption, lactate release). However, changes of these parameters upon combined stimulation were not greater than those induced by stimulation of each individual receptor. At the same time, combined stimulation synergistically induced pro-inflammatory cytokine production and mRNA expression at relatively late time points (4–9 hours) after addition of agonists. In all, metabolic reprogramming may support synergistic induction of cytokines upon combined NOD1 and TLR4 stimulation; however, the origin of this synergy is in the synergistic induction of cytokine gene expression.

Key words: macrophages, muramyl peptides, NOD1, TLR4, tumor necrosis factor

Authors:

Murugina N. E., junior researcher, Laboratory of Clinical Immunology, National Research Center "Institute of Immunology" of the Federal Medical-Biological Agency of Russia, Moscow, Russia;

Budikhina A. S., PhD, researcher, Laboratory of Clinical Immunology, National Research Center "Institute of Immunology" of the Federal Medical-Biological Agency of Russia, Moscow, Russia;

Maximchik P. V., PhD, researcher, Faculty of Fundamental Medicine, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia;

Dagil Y. A., researcher, Laboratory of Clinical Immunology, National Research Center "Institute of Immunology" of the Federal Medical-Biological Agency of Russia, Moscow, Russia;

Balyasova L. S., junior researcher, Laboratory of Clinical Immunology, National Research Center "Institute of Immunology" of the Federal Medical-Biological Agency of Russia, Moscow, Russia;

Murugin V. V., PhD, researcher, Laboratory of Clinical Immunology, National Research Center "Institute of Immunology" of the Federal Medical-Biological Agency of Russia, Moscow, Russia;

Chkadua G. Z., PhD, senior researcher, Laboratory of experimental diagnostics and biotherapy of tumors, FSBI "N. N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology" of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia;

Pinegin B. V., Professor, Doctor of medical sciences, Head of the Department of immunodiagnostics and immunocorrection, National Research Center "Institute of Immunology" of the Federal Medical-Biological Agency of Russia, Moscow, Russia;

Pashenkov M. V., ✉ Doctor of medical sciences, Acting head of the Laboratory of Clinical Immunology, National Research Center "Institute of Immunology" of the Federal Medical-Biological Agency of Russia, Moscow, Russia. E-mail: mvpashenkov@yandex.ru

СОСТОЯНИЕ СОЕДИНИТЕЛЬНОВТКАННЫХ ЭЛЕМЕНТОВ ПРИ ДИФФУЗНОМ ТОКСИЧЕСКОМ ПОВРЕЖДЕНИИ ПЕЧЕНИ И ЕГО КОРРЕКЦИИ

© 2019 г. С. Ю. Медведева^{1,2}, З. А. Шафигуллина^{1,2*}, И. Г. Данилова^{1,2}

*E-mail: zлата_pyankova@mail.ru

¹ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б. Н. Ельцина»,
Институт естественных наук и математики, Екатеринбург, Россия;

²ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения Российской академии наук»,
Екатеринбург, Россия

Поступила: 27.02.2019. Принята: 11.03.2019

На модели диффузного токсического повреждения печени тетрахлорметаном (CCl₄) и его коррекции аминокетидом (АФГ) у крыс проведена оценка реакции тучных клеток (ТК) и степени фиброза. Структурные нарушения и угнетение регенераторных процессов в печени в условиях химической травмы сопровождались усилением миграции ТК в портальную строму и увеличением содержания секреторных гранул в них. Применение АФГ способствует нормализации площади, занимаемой коллагеном в ткани печени, и снижает количество ТК, но поддерживает высокое содержание секреторных гранул в них.

Ключевые слова: тучные клетки, коллаген, печень, тетрахлорметан

DOI: 10.31857/S102872210006647-6

Адрес: 620049 Екатеринбург, ул. Первомайская 106, ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения Российской академии наук», лаборатория морфологии и биохимии, Медведева Светлана Юрьевна.

Тел./факс: +7 (343) 374 00 70.

E-mail: medvedeva-ran@yandex.ru

Авторы:

Медведева С. Ю., к.м.н., доцент кафедры медицинской биохимии и медицинской биофизики Уральского федерального университета имени первого Президента России Б. Н. Ельцина, ведущий научный сотрудник Института иммунологии и физиологии Уральского отделения РАН, Екатеринбург, Россия;

Шафигуллина З. А. аспирант Уральского федерального университета имени первого Президента России Б. Н. Ельцина, Институт естественных наук и математики, м.н.с. Института иммунологии и физиологии Уральского отделения РАН, Екатеринбург, Россия;

Данилова И. Г., д.б.н., доцент, заведующая лабораторией морфологии и биохимии Института иммунологии и физиологии Уральского отделения РАН, Екатеринбург, Россия.

ВВЕДЕНИЕ

Токсическое повреждение печени сопровождается развитием воспалительной реакции. Одним из проявлений воспаления является ак-

тивация клеточных элементов синтезирующих коллаген и гликозаминогликаны. Известно, что в регуляции восстановительных процессов при повреждении печени участвуют клеточные элементы соединительной ткани, в частности, тучные клетки (мастоциты). ТК являются биологическими регуляторами, поскольку могут синтезировать цитокины, молекулы адгезии, гликозаминогликаны, участвуют во всех фазах воспаления, регулируют репаративные процессы в различных органах [1]. Неадекватное количество и (или) функциональная активность ТК может сопровождаться нарушением соотношения фаз воспалительного процесса и проявляться в виде увеличения некротизированных клеток, развития цирроза и как следствие, угнетение регенераторных процессов в печени. При длительном воздействии патогенного фактора в печени усиливается образование коллагеновых структур, что способствует развитию фиброза. В связи с этим, целью исследования было оценить реакцию ТК и степень фиброза печени при диффузном токсическом повреждении печени и его коррекции.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперимент по моделированию диффузного токсического повреждения печени был выполнен на 40 крысах-самцах линии Wistar массой 180 ± 10 г, одобрен локальным этическим комитетом Института иммунологии и физиологии Уральского отделения РАН и соответствует принципам Директивы 2010/63/ЕС Европейского парламента и Европейского Совета по защите животных, используемых в научных целях.

Были сформированы следующие экспериментальные группы животных: интактная, CCl_4 3 сутки, CCl_4 7 сутки, CCl_4 , 14 сутки, CCl_4 + АФГ 3 сутки, CCl_4 + АФГ 7 сутки, CCl_4 + АФГ 14 сутки. Для создания модели диффузного токсического повреждения печени использовали CCl_4 , который вводили крысам однократно внутривентрально в дозе 50 мг/100 г массы тела. Инъекции аминоталгидразида осуществлялись в течение всего эксперимента внутримышечно из расчета 2 мг/кг. Интактную группу составляли здоровые животные. Животных опытных групп выводили из эксперимента на 3, 7 и 14 сутки передозировкой диэтилового эфира.

Тучные клетки печени выявляли при окраске гистологических срезов толуидиновым синим, с помощью программы Leica Application Suite (V4) подсчитывали их количество в единице площади в 20-ти полях зрения при увеличении $\times 1000$ микроскопа Leica DM 2500. Для оценки функциональной активности ТК измеряли интенсивность окрашивания толуидиновым синим сульфатированных гликозаминогликанов в составе секреторных гранул цитоплазмы, показатель выражали в единицах оптической плотности.

Для выявления коллагена в ткани печени проводили окрашивание гистологических срезов пикросириусом красным. С использованием лазерного сканирующего конфокального микроскопа LSM 710 (ZEISS) и стандартных фильтров FITC и родамин получали изображения в формате jpg [2]. Далее с помощью программы ImageJ проводили подсчет площади коллагена и выражали в процентах от общей площади ткани.

Статистическая обработка результатов выполнена с помощью пакета программ Statistica 10.0 и непараметрического критерия Манна-Уитни для 2-х независимых выборок ($p < 0.05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ

В соответствии с морфометрическими данными на 3 сутки после введения токсиканта от-

мечается достоверное увеличение количества ТК с $51,2 \pm 4,9$ кл/мм² (интактная группа) до $94,7 \pm 12,7$, а также увеличение количества секреторных гранул в каждой ТК с $0,045 \pm 0,011$ ус. ед. до $0,071 \pm 0,015$ ус. ед. относительно показателей интактных животных. Данное увеличение может быть обусловлено миграцией ТК в место повреждения. В модели индуцированного CCl_4 повреждения печени рядом исследователей было обнаружено увеличение числа ТК в портальных областях, которое постепенно возрастало по мере увеличения степени фиброза [3]. На 7 и 14 сутки воздействия CCl_4 количество ТК увеличивается до значений $219,76 \pm 35,95$ кл/мм² и $210,6 \pm 33,23$ кл/мм² соответственно, а снижение оптической плотности свидетельствует об активной дегрануляции. Применение АФГ приводит не только к увеличению числа ТК, но и способствует повышению содержания секреторных гранул в них.

При оценке степени фиброза в ткани печени на фоне токсического воздействия на 3 и 7 сутки отмечается незначительное увеличение средней площади, занимаемой коллагеном. На 14 сутки площадь коллагена возрастает в 5 раз по сравнению с показателями интактных животных. На фоне применения АФГ на 3 и 14 сутки отмечается уменьшение площади коллагена в печени по сравнению с группами соответствующего срока без лечения.

ВЫВОДЫ

Токсическое действие CCl_4 приводит к увеличению площади занимаемой коллагеном и сопровождается миграцией тучных клеток в портальную строму, а также увеличением содержания секреторных гранул в них. Применение АФГ способствует уменьшению площади коллагена и количества тучных клеток в печени крыс при диффузном токсическом повреждении. Вероятно, использование агентов, стабилизирующих миграцию тучных клеток в печень, может способствовать уменьшению альтерации и стимуляции регенерации.

Исследование проведено с использованием оборудования ЦКП ИИФ УрО РАН и в рамках бюджетной программы № Гос. регистрации – АААА-А18-118020590107-0.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Юшков Б. Г., Черешнев В. А., Климин В. Г., Арташян О. С. Тучные клетки: физиология и патофизиология. Медицина, М 2011, 240. [Yushkov B. G.,

- Chereshnev V.A., Klimin V.G., Artashyan O.S.* Mast cells: physiology and pathophysiology. *Medicine, M* 2011. 240].
2. *Vogel B., Siebert H., Hofmann U., Frantz S.* Determination of collagen content within picrosirius red stained paraffin-embedded tissue sections using fluorescence microscopy. *MethodsX*. 2015, 2, 124–134.
3. *Francis H., Cynthia J., Meininger A.* Review of mast cells and liver disease: What have we learned? *Digestive and Liver Disease*. 2010, 42, 529–536.

THE STATE OF CONNECTIVE TISSUE ELEMENTS OF THE LIVER WITH DIFFUSE TOXIC DAMAGE AND ITS CORRECTION

© 2019 S. Yu. Medvedeva^{1,2}, Z. A. Shafigullina^{1,2*}, I. G. Danilova^{1,2}

*E-mail: z_lata_pyankova@mail.ru

¹*Institute of Natural Sciences and Mathematics of the Ural Federal University named after the first President of Russia Boris Yeltsin. Ekaterinburg, Russia;*

²*Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch of RAS. Ekaterinburg, Russia*

Received: 27.02.2019. **Accepted:** 11.03.2019

An experimental model of diffuse toxic rat liver damage with carbon tetrachloride (CCl₄) and its correction by aminophthalhydrazide (APH) was used to evaluate the response of mast cells and the degree of fibrosis. Structural disorders and suppression of regenerative processes in the liver under conditions of chemical trauma were accompanied by increased migration of mast cells to the portal stroma and an increased content of secretory granules in them. The use of APH contributes to the normalization of the area, occupied by collagen in the liver tissue, and reduces the number of mast cells, but maintains a high content of secretory granules in them.

Key words: mast cells, collagen, liver, carbon tetrachloride

Authors:

Medvedeva S. Yu., ✉ Ph.D. of Medical Sciences Institute of Natural Sciences and Mathematics of the Ural Federal University named after the first President of Russia Boris Yeltsin, associate professor leading researcher of the Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch of RAS, Ekaterinburg, Russia. **E-mail:** medvedeva-ran@yandex.ru;

Shafigullina Z. A., post-graduate student of the Ural Federal University named after the first President of Russia Boris Yeltsin, junior researcher of the Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch of RAS, Ekaterinburg, Russia;

Danilova I. G., doctor of biological sciences, associate professor of the Ural Federal University named after the first President of Russia Boris Yeltsin, head of the Laboratory of Morphology and Biochemistry of the Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch of RAS, Ekaterinburg, Russia.

ОСОБЕННОСТИ РЕАКЦИИ ТУЧНЫХ КЛЕТОК ОРГАНИЗМА НА ХРОНИЧЕСКОЕ МЕСТНОЕ ВОСПАЛЕНИЕ

© 2019 г. Е. А. Мухлынина^{1*}, О. В. Яковлева²

*E-mail: elena.mukhlynina@yandex.ru

¹ФБГУН «Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения
Российской академии наук», Екатеринбург, Россия;

²ГБОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России
Б. Н. Ельцина», Екатеринбург, Россия

Поступила: 12.03.2019. Принята: 25.03.2019

Хроническое продуктивное воспаление вызывает развитие общего регенераторного ответа организма, непосредственное участие в котором принимают и тучные клетки. При этом стадийность тучноклеточной реакции согласуется с классической схемой развития воспаления. Первоначальная активация секреции на более поздних сроках сменяется процессами накопления медиаторов и пополнением пула тучных клеток в тканях.

Ключевые слова: тучные клетки, хроническое воспаление, секреция, генерализованная реакция

DOI: 10.31857/S102872210006646-5

Адрес: 620049 Екатеринбург, ул. Первомайская, д.106,
ФБГУН «Институт иммунологии и физиологии Уральского
отделения Российской академии наук», лаборатория мор-
фологии и биохимии, Мухлынина Елена Артуровна.
Тел./факс: +7(343) 374 00 70, 8 902 877 12 12 (моб.).

E-mail: elena.mukhlynina@yandex.ru

Авторы:

Мухлынина Е. А., к.б.н., научный сотрудник лаборатории
морфологии и биохимии Институт иммунологии и физио-
логии Уральского отделения Российской академии наук,
Екатеринбург, Россия;

Яковлева О. В., студентка департамента «Биологический
факультет» Уральского федерального университета имени
первого Президента России Б. Н. Ельцина», Екатеринбург,
Россия.

ВВЕДЕНИЕ

Вопросы участия тучных клеток в регуляции физиологических функций организма, компенсаторно-приспособительных процессах активно обсуждаются исследователями. При этом внимание специалистов обычно сфокусировано на изучении местных реакций тучноклеточного звена. Сформулированная в последние годы теория системного воспаления поднимает вопросы генерализованных реакций соединительной ткани и ее компонентов на локальные воздействия.

Цель исследования: дать характеристику реакции тучных клеток различных органов крыс

(надпочечники, тимус, желудок, кишечник, кожа) при хроническом воспалении.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа выполнена на 40 крысах-самцах линии Wistar массой 250–300 г в соответствии с принципами Директивы 2010/63/EU ЕС. Реакцию тучных клеток исследовали на экспериментальной модели хронического продуктивного воспаления (введение под кожу спины в асептических условиях стерильного ватного тампона массой 15 мг [1]). Анализ состояния мастоцитов проводили на 4, 7 и 14 сутки от начала воздействия в капсуле надпочечников, тимусе, желудке, кишечнике, коже в очаге воспаления и с брюшной стороны тела путем оценки общего количества клеток и их секреторной активности. Материал фиксировали в жидкости Карнуа. Гистологические препараты готовили по общепринятым методикам с последующим окрашиванием толудиновым синим. Анализ препаратов проводили с помощью микроскопа Leica DM2500 и программы анализа изображений ВидеоТест Морфология 5.2. при увеличении объектива в 100 раз в 20 полях зрения с пересчетом на 0,01 мм². Секреция тучных клеток оценивалась

по их оптической плотности, коэффициенту дегрануляции – показателю апокриновой секреции (как процент дегранулирующих клеток), индексу суммарного гранулолизиса – показателю мерокриновой секреции [2]. Общепринятый метод классификации мастоцитов для расчета индекса суммарного гранулолизиса был модифицирован – тучные клетки подразделяли на 4 типа по величине оптической плотности, т.е. количественно, и рассчитывали индекс суммарного гранулолизиса, как процент клеток с оптической плотностью менее 0,4 условных единиц. Оценка гематологических показателей периферической крови животных проводилась при помощи гематологического анализатора Celly 70. Анализ данных выполнен в пакете статистических программ STATISTICA 6.0 (StatSoft, Inc. 2001). Данные представлены в виде среднего арифметического (M) \pm стандартная ошибка среднего (m). При проверке статистических гипотез использовали непараметрический критерий Манна-Уитни (Mann-Whitney U test) с 5% уровнем значимости.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенные исследования свидетельствуют, что в периферической крови экспериментальных животных наблюдается стереотипная для развития воспаления картина: преходящая лейко- и лимфопения, уменьшение числа средних клеток, которые к 7 суткам сменяются стойким нейтрофильным лейкоцитозом. Наиболее выраженная реакция красной крови отмечается на 7 сутки развития хронического воспаления, когда снижаются показатели гемоглобина, гематокрита, средний объем эритроцитов и среднее содержание гемоглобина в них. К 14 суткам снижается содержание тромбоцитов и тромбокрит.

В очаге хронического продуктивного воспаления при этом наблюдается стойкое увеличение числа тучных клеток и показателей их секреторной активности. При этом секреция преимущественно идет по апокриновому типу. В коже с брюшной стороны, на существенном удалении от очага воспаления, при этом также отмечается существенное повышение содержания мастоцитов, снижение их оптической плотности, увеличение показателей их секреторной активности за счет обоих типов секреции.

В капсуле надпочечников при хроническом воспалении в исследуемые сроки количественные и функциональные показатели тучных клеток практически не изменяются. В соединитель-

нотканых трабекулах тимуса на 4 сутки после повреждения отмечается снижение оптической плотности мастоцитов, но в более поздние сроки соотношение процессов синтеза и секреции биологически активных веществ тучных клеток возвращается к контрольным значениям. В то же время именно к 7 суткам и позднее в тимусе возрастает количество мастоцитов.

В собственной пластинке слизистой и подслизистой желудка и кишечника при хроническом воспалении количество тучных клеток увеличивается, при этом также увеличивается и оптическая плотность клеток, что говорит о превалировании процессов синтеза и накопления секрета над его секрецией.

В проведенных ранее исследованиях было показано, что экстремальные воздействия вызывают в ранние сроки системную неспецифическую реакцию тучных клеток, проявляющуюся в виде активации их секреции, повышении доли гранулолизиса [2], перераспределении тучных клеток в организме [3]. В то же время специфические реакции взаимосвязаны с природой повреждающего агента, а также особенностями органа.

Хроническое продуктивное воспаление вызывает развитие общего регенераторного ответа организма, непосредственное участие в котором принимают и тучные клетки. В коже, органе, который подвергается непосредственному повреждению, как в очаге воспаления, так и на удалении от него, реакция тучных клеток максимальна, заключается как в привлечении мастоцитов, так и в интенсификации процессов секреции на протяжении всего времени исследования. В железистых, эндокринных органах секреторный ответ тучных клеток развивается в кратчайшие сроки, наибольшей реактивностью характеризуется соединительная ткань надпочечников [2], вероятно, поэтому к 4 суткам состояние мастоцитов надпочечников соответствует контролю, а в тучных клетках тимуса отмечается преходящее снижение содержания БАВ, которое позднее сменяется накоплением медиаторов. В желудке и кишечнике повышение содержания тучных клеток на поздних сроках также ассоциировано с ростом их оптической плотности. Таким образом, ранняя реакция выброса медиаторов из тучных клеток в удаленных от очага воспаления органах в более поздние сроки сменяется процессами их накопления в мастоцитах.

Полученные результаты подтверждают полученные ранее данные, что фазные изменения соединительной ткани в ответ на местное

повреждение носят не локальный, а генерализованный характер. Выраженность реакции мастоцитов взаимосвязана с функциональной активностью органа. При этом стадийность процессов соответствует классической схеме развития воспалительной реакции: на более поздних сроках экссудативные явления сменяются регенераторным ответом.

Исследования выполнены в рамках гос. задания ИИФ УрО РАН, тема № АААА-А18-118020590107-0.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Мосесова Н. С. Исследование противовоспалительных свойств мексидола при экспериментальном остром и хроническом воспалении: автореф.
2. Мухлынина Е. А. Реакция волокнистой соединительной ткани при действии на организм экстремальных факторов: автореф. дисс...канд. биол. наук – Екатеринбург, 2013. – 24 с. [Mukhlynina E. A. Fibrous connective tissue reaction under the action of extreme factors on the body. Author's abstractdiss. – Ekaterinburg, 2013. – 24 p.]
3. Арташян О. С., Юшков Б. Г., Мухлынина Е. А. Изучение функциональной активности тучных клеток при иммобилизационном стрессе / Цитология. – 2006. – Т. 48, № 8. – С. 665–668. [Artashyan O. S., Yushkov B. G., Mukhlynina E. A. A Study of mast cell functional activity at immobilizative stress / Tsitologiya. – 2006. – V. 48, № 8. – P. 665–668.]

SOME FEATURES OF MAST CELL REACTION ON CHRONIC LOCAL INFLAMMATION

© 2019 Е. А. Mukhlynina^{1*}, О. В. Yakovleva²

*E-mail: elena.mukhlynina@yandex.ru

¹Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch of RAS, Ekaterinburg, Russia;

²Ural Federal University named after the first President of Russia B. N. Yeltsin, Ekaterinburg, Russia

Received: 12.03.2019. Accepted: 25.03.2019

Chronic productive inflammation causes the development of general regenerative response, in which mast cells are directly involved. Staging of their reaction is consistent with the classical inflammation-development pattern. The processes of mediators' accumulation and the replenishment of the mast cell tissue pool replace the initial secretion activation.

Key words: mast cells, chronic inflammation, secretion, generalized reaction

Authors:

Mukhlynina E. A., ✉ Ph.D. of Biological Sciences, Researcher of Laboratory of Morphology and Biochemistry, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch of RAS, Ekaterinburg, Russia. **E-mail:** elena.mukhlynina@yandex.ru;

Yakovleva O. V., Student of Biology Department, Ural Federal University named after the first President of Russia B. N. Yeltsin, Ekaterinburg, Russia.

НЕОДНОЗНАЧНОСТЬ ВЛИЯНИЙ РЕГУЛЯТОРНЫХ ПЕПТИДОВ И РЕКОМБИНАНТНОГО IFN α НА ФЕНОТИП СУБПОПУЛЯЦИИ CD66b⁺CD33⁺CD16⁺CD11b⁺ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ В СИСТЕМЕ *IN VITRO*

© 2019 г. И. В. Нестерова^{1,2*}, Г. А. Чудилова¹, С. В. Ковалева¹,
Л. В. Ломтатидзе¹, Т. В. Русинова¹, В. А. Тараканов¹,
Н. К. Барова¹, В. Н. Павленко¹

*E-mail: inesterova1@yandex.ru

¹ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет»
Минздрава России, Краснодар, Россия

²ФГБОУ ВО «Российский университет дружбы народов» Министерства
образования и науки России, Москва, Россия

Поступила: 14.03.2019. Принята: 26.03.2019

Воспроизведена в системе *in vitro* модель бактериального процесса под действием fMLP, позволившая выявить особенности трансформации CD66b⁺CD33⁺CD16⁺CD11b⁺ нейтрофильных гранулоцитов (НГ). Выявлены разнонаправленные эффекты моновливания пептидов и rIFN α 2b на экспрессию изучаемых маркеров НГ у условно-здоровых детей. Модулирующее влияние rIFN α 2b на трансформированный fMLP фенотип НГ сопряжено с поляризацией в противовоспалительный фенотип.

Ключевые слова: нейтрофильные гранулоциты, фенотип, субпопуляции

DOI: 10.31857/S102872210006645-4

Адрес: 117513, г. Москва, Ленинский проспект, 123–1, ФГБОУ ВО «Российский университет дружбы народов», кафедра аллергологии и иммунологии, Нестерова Ирина Вадимовна. Тел.: 8 (916) 187 73 41 (моб.).

E-mail: inesterova1@yandex.ru

Авторы:

Нестерова И. В., д.м.н., профессор, профессор кафедры аллергологии и иммунологии, Российский университет дружбы народов, Москва, Россия; г.н.с. ЦНИЛ, КубГМУ, Краснодар, Россия;

Чудилова Г. А., к.б.н., доцент, зав. отделом клинико-экспериментальной иммунологии и молекулярной биологии ЦНИЛ, КубГМУ, Краснодар, Россия;

Ковалева С. В., к.м.н., доцент, с.н.с. ЦНИЛ КубГМУ, Краснодар, Россия;

Ломтатидзе Л. В., к.б.н., с.н.с. ЦНИЛ, КубГМУ, Краснодар, Россия;

Русинова Т. В., к.б.н., н.с. ЦНИЛ, КубГМУ, Краснодар, Россия;

Тараканов В. А., д.м.н., профессор, зав. кафедрой хирургических болезней детского возраста, КубГМУ, Краснодар, Россия;

Барова Н. К., к.м.н., ассистент кафедры хирургических болезней детского возраста, КубГМУ, Краснодар, Россия;

Павленко В. Н., ординатор кафедры клинической иммунологии, аллергологии и лабораторной диагностики ФПК и ППС, КубГМУ, Краснодар, Россия.

Нейтрофильные гранулоциты (НГ) способны выполнять различные функции, нередко диаметрально противоположные: про- и противовоспалительные, регулирующие, активирующие и супрессирующие, про- и противоопухолевые и другие, напрямую зависящие от рецепторного оснащения, интра- и экстрацеллюлярного окружения клетки [1–3]. Известные факты о пластичности НГ представляют интерес для использования НГ в качестве экспериментальной модели инфекционно-воспалительного процесса как для установления вариантов неадекватного реагирования (дефектного, гиперэргического), так и с целью изучения возможностей коррекции дискордантной работы НГ под влиянием цитокинов и иммуотропных пептидов. При включении НГ в иммунный ответ происходит дополнительная транслокация внутриклеточных резервных пулов рецепторов на мембрану, что проявляется в приросте высокооснащенных активированных НГ [1–3]. Интерес представляет изучение влияния различных пептидов и рекомбинантного IFN α 2b (rIFN α 2b) на

НГ, конститутивно оснащенные CD16, CD33, CD66b и CD11b, активно участвующими в запуске, регуляции и разрешении воспалительного процесса. Гексапептидаргинил-альфа-аспартил-лизил-валил-тирозил-аргинин (ГП) обладает иммунорегуляторными свойствами, а также способностью вызывать инактивацию свободно-радикальных и перекисных соединений. Глюкозаминил-мурамилдипептид (ГМДП) – аналог пептидогликана клеточной стенки бактерий специфически взаимодействуя с NOD2-рецепторами, активирует НГ, запуская синтез провоспалительных цитокинов. $\text{rIFN}\alpha 2\text{b}$ оказывает противовирусное действие, обусловленное взаимодействием со специфическими мембранными рецепторами, запускающими синтез РНК; обладает иммуномодулирующей активностью, связанной с активацией фагоцитоза, стимуляцией образования антител и цитокинов. В основе антибактериального эффекта IFN лежит способность индуцировать активность ферментов (индоламин-2,3-дезоксигеназу, NO-синтетазу) в клетке, которые способствуют разрушению бактерии. N-формил-метионил-лейцил-фенилаланин (fMLP) имеет экзогенное (белок многих бактерий) и эндогенное (в митохондриях человека) происхождения и используется для создания экспериментальной модели бактериального процесса, так как активирует широкий спектр сигнальных путей, индуцирует хемотаксис, фагоцитоз, генерацию активных форм кислорода и высвобождение антимикробных молекул из гранул НГ.

Цель исследования: Изучение эффектов влияния fMLP, ГМДП, ГП, $\text{rIFN}\alpha 2\text{b}$ на уровень экспрессии функционально значимых рецепторов НГ (CD16, CD66b, CD33, CD11b) у здоровых детей в эксперименте *in vitro*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследованы образцы периферической крови (ПК) 10 здоровых детей 3,5–5,5 лет. Проведена оценка количества НГ (%) и плотность экспрессии (MFI) их мембранных рецепторов CD16, CD66b, CD33, CD11b (МКАТ «Beckman Coulter International S.A.», Франция) на НГ: 1) ПК (контроль); 2) моноинкубация с $\text{rIFN}\alpha 2\text{b}$, ГМДП, ГП (в концентрациях 10^{-6} г/л), fMLP (10^{-7} М); 3) на НГ, трансформированных под влиянием fMLP и $\text{rIFN}\alpha 2\text{b}$, ГМДП, ГП. Инкубацию проводили в течение 1 часа при 37 °С. Статистическая обработка StatPlus 2009.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ полученных данных продемонстрировал, что НГ ПК условно-здоровых детей в 97,03% (94,31; 98,40) одновременно оснащены рецепторами CD16, CD66b, CD33, CD11b с разной плотностью экспрессии. Так, выявлен высокий уровень MFI CD16 – 139,0 (115,3; 152,3), низкий MFI CD66b – 4,6 (4,2; 5,0), MFI CD33 – 3,7 (3,3; 4,6) и средний MFI CD11b – 18,3 (15,8; 21,0). Инкубация ПК с fMLP приводила к достоверному значительному увеличению плотности экспрессии на НГ CD66b (в 2,5 раза), CD11b (в 1,9 раза), CD16 (в 1,4 раза), что свидетельствует о готовности к адекватному активному ответу НГ здоровых детей на экзо- и эндогенные воздействия. Отсутствие активации CD33 после стимуляции fMLP НГ в контрольной группе, говорит о рефрактерности этого рецептора к хемотаксическим стимулам. Инкубация ПК с $\text{rIFN}\alpha 2\text{b}$ выявила разнонаправленное влияние на экспрессию изучаемых рецепторов. Показано достоверное возрастание MFI CD66b (в 1,5 раза) и снижение MFI CD11b (в 1,4 раза) на фоне отсутствия эффектов по отношению к MFI CD33 и MFI CD16. Вероятно, что под действием $\text{rIFN}\alpha 2\text{b}$ НГ реагируют как при вирусной инфекции: происходит усиление хемотаксических свойств клетки, сдерживание запуска фагоцитоза и перепрограммирование НГ на реакцию АЗКЦ. ГМДП не влиял на экспрессию изучаемых рецепторов НГ у условно-здоровых детей, проявив свои известные модулирующие свойства: выявлены лишь тенденции к незначительному увеличению MFI CD16, MFI CD66b и снижению уровня экспрессии CD33 и CD11b. Инкубация ПК с ГП позволила выявить эффекты, противоположные ГМДП: снижение уровня экспрессии CD33 (в 1,3 раза) и CD11b (в 2 раза) и отсутствие эффекта по отношению к рецепторам CD16 и CD66b. При оценке совместного воздействия fMLP и изучаемых пептидов установлено, что плотность экспрессии определяемых рецепторов оставалась на уровне показателей профиля НГ, активированного под влиянием fMLP. При этом при инкубации НГ ПК с fMLP и $\text{rIFN}\alpha 2\text{b}$ были выявлены тенденции к снижению плотности экспрессии CD16 и повышению CD66b и CD11b рецепторов по отношению к значениям, регистрируемым при действии fMLP.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в результате исследования была воспроизведена в системе *in vitro* модель

бактериального процесса при инкубации НГ ПК с fMLP, позволившая выявить трансформацию фенотипа CD66b⁺CD33⁺CD16⁺CD11b⁺ НГ в виде усиления экспрессии всех изучаемых рецепторов, за исключением CD33. Установлены разнонаправленные эффекты при моно-влиянии различных пептидов (ГП и ГМДП) и rIFN α 2b на экспрессию изучаемых маркеров, экспонированных на поверхности мембран НГ условно-здоровых детей. Показано модулирующее влияние rIFN α 2b на трансформированный fMLP фенотип субпопуляции CD66b⁺CD33⁺CD16⁺CD11b⁺ НГ, способствующее поляризации провоспалительного фенотипа НГ в противовоспалительный.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Нестерова И. В., Колесникова Н. В., Чудилова Г. А., Ломтатидзе Л. В., Ковалева С. В., Евглевский А. А., Нгуен Т. З. Л. Новый взгляд на нейтрофильные гранулоциты: переосмысление старых догм. (Часть 2). Инфекция и иммунитет 2018, 8(1), 7–18. [Nesterova I. V., Kolesnikova N. V., Chudilova G. A., Lomtatidze L. V., Kovaleva S. V., Yevglevsky A. A., Nguyen T. Z. L. A new look at neutrophilic granulocytes: rethinking old dogmas. (Part 2). Infection and immunity 2017, 7(3), 219–230. Russian].
2. Scapini P., Marini O., Tecchio C., Cassatella M. A. Human neutrophils in the saga of cellular heterogeneity: insights and open questions. Immunol. Rev. 2016, 273(1) 48–60.
3. Garley M., Jabłońska E. Heterogeneity among neutrophils. Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz). 2018, 66(1), 21–30.

INFLUENCY OF INFLUENCES OF REGULATORY PEPTIDES AND RECOMBINANT IFN α ON THE PHENOTYPE OF THE SUBSET CD66b⁺CD33⁺CD16⁺CD11b⁺NEUTROFIL GRANULOCYTES *IN VITRO*

© 2019 I. V. Nesterova^{1,2*}, G. A. Chudilova¹, S. V. Kovaleva¹, L. V. Lomtatidze¹, T. V. Rusinova¹, V. A. Tarakanov¹, N. K. Barova¹, V. N. Pavlenko¹

*E-mail: inesterova1@yandex.ru

¹Kuban State Medical University, Krasnodar, Russia;

²Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russia

Received: 14.03.2019. **Accepted:** 26.03.2019

A model of the bacterial process under the influence of fMLP was reproduced in the *in vitro* system, which made it possible to reveal the features of the transformation of CD66b⁺CD33⁺CD16⁺CD11b⁺ neutrophil granulocytes (NG). Multidirectional effects of mono-effects of peptides and rIFN α 2b on the expression of the studied markers of NG in healthy children were identified. The modulating effect of rIFN α 2b on the transformed fMLP phenotype of NG is associated with polarization into an anti-inflammatory phenotype.

Key words: neutrophilic granulocytes, phenotype, subset

Authors:

Nesterova I. V., MD, Professor, Department of Allergology and Immunology, Peoples' Friendship University, Moscow, Russia; Chief Researcher, Central Research Laboratory, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russia. **E-mail:** inesterova1@yandex.ru;

Chudilova G. A., PhD (Biological Sciences), Head of Department, Central Research Laboratory, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russia;

Kovaleva S. V., Ph.D. (Medical Science), Senior Researcher, Central Research Laboratory, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russia;

Lomtatidze L. V., PhD (Biological Sciences), Senior Researcher, Central Research Laboratory, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russia;

Rusinova T. V., Ph.D. (Biological Sciences), Researcher, Central Research Laboratory, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russia;

Tarakanov V. A., MD, Professor, Head of the Department of Surgical Diseases of Childhood, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russia;

Barova N. K., PhD, Assistant of the Department of Surgical Diseases of Childhood, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russia;

Pavlenko V. N., resident, Department of Clinical Immunology, Allergology and Laboratory Diagnostics, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russia.

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ РЕАКТИВНОСТИ НА ТЕЧЕНИЕ МИКОБАКТЕРИАЛЬНОЙ ИНФЕКЦИИ У БОЛЬНЫХ ТУБЕРКУЛЕЗОМ ЛЕГКИХ

© 2019 г. И. Ю. Никитина*, Я. В. Сердюк, Т. А. Ненашева,
В. А. Шорохова, Т. Р. Багдасарян, И. В. Лядова

*E-mail: redwings2009@yandex.ru

ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза»,
Москва, Россия

Поступила: 15.03.2019. Принята: 29.03.2019

Соотношение между содержанием воспалительных и регуляторных цитокинов, участвующих в реакциях иммунного ответа при инфекции *M. tuberculosis* (*Mtb*), определяет характер течения туберкулеза легких (ТБ). С помощью мультиплексного анализа с использованием технологии *X-map* мы исследовали содержание 44 цитокинов, связанных с врожденным и адаптивным иммунитетом, в индуцированной антигенами *Mtb* плазме (Аг-плазма) и сыворотке больных ТБ и здоровых доноров, контактировавших с больными ТБ («контакты»). У больных ТБ по сравнению с «контактами» было повышено содержание IL-2, IFN- γ , IP-10 ($p < 0.005$) в Аг-плазме. Для больных ТБ с исходно высоким содержанием 12 из 44 цитокинов в Аг-плазме были характерны более тяжёлое течение ТБ и медленная отвечаемость на противотуберкулезную терапию по сравнению с пациентами с исходно низким содержанием данных цитокинов. Полученные результаты позволяют заключить, что при активном ТБ происходит увеличение содержания воспалительных цитокинов IL-2, IFN- γ , и IP-10. Оценка исходного уровня реактивности иммунного ответа у больных ТБ позволяет прогнозировать тяжесть течения заболевания и отвечаемость больного на противотуберкулезную терапию.

Ключевые слова: туберкулез, цитокины

DOI: 10.31857/S102872210006644-3

Адрес: 107564 г. Москва, Яузская аллея, д. 2, ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза», лаборатория биотехнологии отдела иммунологии, Никитина Ирина Юрьевна.

Тел./факс: +7(499) 785 90 35, 8 926 948 27 27 (моб.).

E-mail: redwings2009@yandex.ru

Авторы:

Никитина И. Ю., к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории биотехнологии отдела иммунологии ФГБНУ «Центрального научно-исследовательского института туберкулеза», Москва, Россия;

Сердюк Я. В., младший научный сотрудник лаборатории биотехнологии отдела иммунологии ФГБНУ «Центрального научно-исследовательского института туберкулеза», Москва, Россия;

Ненашева Т. А., к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории биотехнологии отдела иммунологии ФГБНУ «Центрального научно-исследовательского института туберкулеза», Москва, Россия;

Шорохова В. А., врач-фтизиатр отдела фтизиатрии ФГБНУ «Центрального научно-исследовательского института туберкулеза», Москва, Россия;

Багдасарян Т. Р., к.м.н., врач-фтизиатр, зав. первым терапевтическим отделением отдела фтизиатрии ФГБНУ «Цен-

трального научно-исследовательского института туберкулеза», Москва, Россия;

Лядова И. В., д.м.н., зав. лабораторией биотехнологии ФГБНУ «Центрального научно-исследовательского института туберкулеза», Москва, Россия.

Туберкулёз (ТБ) является одним из наиболее распространенных инфекционных заболеваний в мире [1]. Предупреждение распространения ТБ требует эффективных методов диагностики и прогнозирования инфекции. На сегодняшний день активно разрабатываются подходы, направленные на количественную и качественную оценку состояния иммунного ответа организма при инфекции *M. tuberculosis* (*Mtb*). Считается, что эффективный протективный иммунный ответ, обусловленный взаимодействиями между Т-лимфоцитами CD4 и макрофагами, способствует полному «клиренсу» патогена и/или устояновлению латентной туберкулезной инфекции

(ЛТИ), а различные повреждения Т-клеточного звена иммунитета могут приводить к развитию активного ТБ и его прогрессированию [2]. Однако, по данным, полученным на экспериментальной модели туберкулеза, повышенный уровень иммунного ответа также может стать причиной тяжёлого течения заболевания [3], а при исследовании Т-клеточного ответа у больных активным ТБ не было выявлено его недостаточности [4]. Таким образом, нет четкого понимания того, какие иммунологические механизмы, определяют активность ТБ и тяжесть его течения. В связи с этим мы предположили, что одним из механизмов, обуславливающим полиморфизм ТБ, является соотношение между различными провоспалительными и регуляторными цитокинами, связанными с клеточными взаимодействиями между врожденным и адаптивным иммунным ответом.

Целью данной работы явилось исследование взаимосвязи между содержанием различных растворимых факторов (цитокинов, хемокинов, растворимых рецепторов) и течением ТБ.

В исследование было включено 37 больных с впервые выявленным туберкулезом легких (средний возраст составил $33,2 \pm 1,4$; мужчин – 20, женщин – 17) и 26 здоровых доноров с установленным контактом с больными ТБ («контакты»). Наиболее распространенной легочной формой ТБ у больных был инфильтративный ТБ (68%). Тяжесть течения ТБ оценивали фтизиатры при поступлении пациентов в ФГБНУ «ЦНИИТ» и через 2 месяца после лечения по следующим показателям: степень деструкции и распространенности поражения в легочной ткани, уровень бактериовыделения, клиническая тяжесть (температура, жалобы на кашель, одышку и общее состояние). Иммунологические показатели определяли с помощью мультиплексного анализа. При поступлении в ФГБНУ «ЦНИИТ» в сыворотке и антиген-индуцированной плазме («Аг-плазма») больных ТБ определяли уровень продукции 44 провоспалительных и регуляторных цитокинов.

Статистический анализ проводили с использованием программного обеспечения GraphPad и R-studio и применением непараметрических методов: сравнительный анализ Манн-Уитни, корреляционный анализ по Спирмену с поправкой на множественность Бенджамини-Хохберга и иерархическая кластеризация с визуализацией *heatmap*.

Сравнительный анализ с использованием непараметрического критерия Манн-Уитни пока-

зал, что уровень продукции 43 цитокинов (98%) у больных ТБ был выше в «Аг-плазме», чем в сыворотке ($p < 0.05$). У больных отмечали высокий уровень продукции IL-2, IFN- γ , IP-10 в «Аг-плазме» по сравнению с «контактами». При многопараметрическом исследовании уровня продукции 44 цитокинов с помощью корреляционного анализа и иерархической кластеризации удалось разделить больных на группы, различающиеся низким и высоким содержанием 12 цитокинов в «Аг-плазме»: больные с «гипореактивным» и «гиперреактивным» иммунным ответом. Для «гиперреактивных» больных было характерно более тяжелое течение ТБ легких по сравнению с «гипореактивными» пациентами: более высокий уровень бактериовыделения (80% против 27% у «гипореактивных») и наличие полостей распада в легких (65% против 47%). Кроме того, для пациентов с «гиперреактивным» иммунным ответом была характерна медленная отвечаемость на 2-месячный курс противотуберкулезной терапии: медленное заживление полостей распада (80% против 38% у «гипореактивных») и сохранение бактериовыделения (27% против 0%). Таким образом, активный ТБ сопровождается повышенным уровнем продукции воспалительных факторов, связанных с Т-клеточным иммунным ответом. Тяжесть течения ТБ обусловлено иммунологической реактивностью больных ТБ, оценка которой на начальной стадии болезни позволяет прогнозировать течение заболевания и отвечаемость больного на противотуберкулезную терапию.

Работа поддержана грантом РНФ № 17-75-10197

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. WHO. Global tuberculosis report 2018. http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/
2. O'Garra A., Redford P.S., McNab F.W., Bloom C.I., Wilkinson R.J., Berry M.P. The immune response in tuberculosis. *Annu Rev Immunol.* 2013, 31, 475–527.
3. Lyadova I.V. Inflammation and immunopathogenesis of tuberculosis progression. In: Cardona PJ, editor. *Understanding Tuberculosis.* Moscow: Intechopen, 2012, 19–42.
4. Panteleev A., Nikitina I., Burmistrova I., Kosmiadi G., Radaeva T., Amansahedov R., Sadikov P., Serduk Y., Larionova E., Bagdasarian T., Chernousova L., Ganusov V., Lyadova I. Severe tuberculosis in humans correlates best with neutrophil abundance and lymphocyte deficiency and does not correlate with antigen-specific CD4 T cell response. *Frontiers in Immunology,* 2017, 8:963.

**THE INFLUENCE OF IMMUNOLOGICAL REACTIVITY
TO THE MYCOBACTERIAL INFECTION PROCESS IN PATIENTS
WITH PULMONARY TUBERCULOSIS**

© 2019 I. Y. Nikitina*, Y. V. Serduk, T. A. Nenasheva, V. A. Shorochova,
T. R. Bagdasarian, I. V. Lyadova

*E-mail: redwings2009@yandex.ru

FSBRI «Central Tuberculosis Research Institute», Moscow, Russia

Received: 15.03.2019. **Accepted:** 29.03.2019

The ratio between the inflammatory and regulatory cytokines involved in immune response during infection *M. tuberculosis* (*Mtb*) determines the course of pulmonary tuberculosis (TB). We analyzed the production levels of 44 cytokines associated with innate and adaptive immunity by multiplex analysis in antigen-induced plasma (Ag-plasma) and serum of TB patients (TBP) and healthy donors who had contacted with TBP («TBC»). In TBP, the production levels of IL-2, IFN- γ , IP-10 in Ag-plasma were higher than in TBC ($p < 0.005$). TBP with initially increased production levels of 12 cytokines in Ag-plasma were characterized by severe TB and slow responsiveness to anti-TB therapy compared to patients with initially low production levels of these cytokines. In conclusion, the production levels of IL-2, IFN- γ , and IP-10 were increased in patients with active TB. The immune reactivity evaluation of TBP with recently diagnosed TB can predict the TB severity and patients' responsiveness to anti-TB therapy.

Key words: tuberculosis, cytokines

Authors:

Nikitina I. Y., ✉ PhD, Senior Staff Researcher, Central tuberculosis Research Institute, Immunology Department, Moscow, Russia.

E-mail: redwings2009@yandex.ru;

Serdyuk Y. V., PhD student, Junior Staff Researcher, Central tuberculosis Research Institute, Immunology Department, Moscow, Russia;

Nenasheva T. A., PhD, Senior Staff Researcher, Central tuberculosis Research Institute, Immunology Department, Moscow, Russia;

Shorochova V. A., phthisiatrician, PhD student, Central tuberculosis Research Institute, Phthisiology Department, Moscow, Russia;

Bagdasaryan T. R., PhD, phthisiatrician, Head of 1st Phthisiology Department, Central tuberculosis Research Institute, Phthisiology Department, Moscow, Russia;

Lyadova I. V., Doctor of Medical Sc., Head of Biotechnology Laboratory, Central tuberculosis Research Institute, Immunology Department, Moscow, Russia.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БИОМАТЕРИАЛОВ НА ОСНОВЕ БЕЛКОВ ШЕЛКА ДЛЯ МОДУЛЯЦИИ ИММУННОГО ОТВЕТА

© 2019 г. М. А. Носенко^{1,2*}, А. Ю. Архипова^{2,3}, К.-С. Н. Атретханы^{1,2},
М. С. Друцкая¹, С. А. Недоспасов^{1,2}, М. М. Мойсенович²

*E-mail: maxim-nosenko@yandex.ru

¹Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта
Российской академии наук, Москва, Россия;

²Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия;

³ГБУЗ МО МОНИКИ им. М. Ф. Владимирского, Москва, Россия

Поступила: 15.03.2019. Принята: 01.04.2019

В последнее время широкое внимание уделяется применению биоматериалов для целей регенеративной медицины и тканевой инженерии, так как они представляют собой не только структурный каркас для клеточных популяций, но и способны оказывать влияние на функции различных типов клеток. При этом перспективным является направление по разработке биоматериалов на основе белков шелка (например, фиброина или спидроина), которые имеют оптимальные механические характеристики, а также обладают регенеративной активностью. В ходе работы мы продемонстрировали, что композитные матриксы на основе фиброина с добавлением желатина обладают провоспалительными свойствами *in vitro* и *in vivo*, причем эти свойства зависят от конфигурации скаффолдов. Так, культивирование мышечных эмбриональных фибробластов (МЭФ) на трехмерных (3D), но не двумерных (2D) фиброин/желатиновых матриксах приводит к увеличению экспрессии в клетках молекул адгезии ICAM-1 и VCAM-1, а также экспрессии провоспалительных цитокинов TNF и IL-6. Подкожное введение трехмерных фиброин/желатиновых микрочастиц мышам способствует инфильтрации кожи моноцитами и ускоряет заживление полнослойных кожных ран, а имплантация трехмерных матриксов под капсулу почки приводит к кластеризации лимфоцитов и образованию примитивной лимфоидной ткани в импланте. Таким образом, наши данные свидетельствуют об иммуномодулирующих свойствах фиброиновых матриксов, которые могут быть полезны в тканевой инженерии и в регенеративной медицине.

Ключевые слова: фиброин, воспаление, биоинженерия, регенерация, МЭФ, 3D матрикс

DOI: 10.31857/S102872210006642-1

Адрес: 119991 Москва, ул. Вавилова 32, ФГБУН «Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта Российской академии наук», лаборатория молекулярных механизмов иммунитета. Недоспасов Сергей Артурович.

Тел.: +74991352311 (раб.).

E-mail: sergei.nedospasov@gmail.com

Авторы:

Носенко М. А., младший научный сотрудник лаборатории молекулярных механизмов иммунитета Института молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН; аспирант кафедры иммунологии биологического факультета МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия;

Архипова А. Ю., к.б.н., в.н.с. лаборатории конфокальной микроскопии биологического факультета МГУ им. М. В. Ломоносова; старший научный сотрудник Научно-исследовательской лаборатории Государственного бюджетного учреждения здравоохранения Московской области «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М. Ф. Владимирского», Москва, Россия;

Атретханы К.-С.Н., младший научный сотрудник лаборатории молекулярных механизмов иммунитета Института

молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН; аспирант кафедры иммунологии биологического факультета МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия;

Друцкая М. С., к.б.н., в.н.с. лаборатории молекулярных механизмов иммунитета Института молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия;

Недоспасов С. А., acad., проф., д.б.н., заведующий лабораторией молекулярных механизмов иммунитета Института молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН; заведующий кафедрой иммунологии биологического факультета МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия;

Мойсенович М. М., к.б.н., заведующий лабораторией конфокальной микроскопии биологического факультета МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия.

Использование биоматериалов в качестве структурного каркаса для клеток, а также для таргетной доставки препаратов в последнее время активно развивается. Однако до сих пор не

до конца установлено, как различные материалы могут влиять на клетки. Некоторые полимеры считаются относительно инертными, тогда как другие способны вызывать изменения в фенотипе различных клеточных популяций [1]. Это влияние опосредовано, с одной стороны, сигнальными последовательностями в составе полимера, а с другой стороны, связано с особенностями пространственной организации матрикса. В результате, ряд биополимеров может обладать иммуномодулирующими свойствами, которые могут представлять интерес в клинике. Наша работа сфокусирована на исследовании таких свойств биоинженерных матриксов, сконструированных на основе белка шелка тутового шелкопряда – фиброина [2]. Мы обнаружили, что композитные фиброин/желатиновые скаффолды (желатин необходим для стимуляции клеточной адгезии [3]), в зависимости от их конфигурации, могут обладать провоспалительными свойствами. Так, при культивировании мышечных эмбриональных фибробластов (МЭФ) на трехмерных (3D), но не двумерных (2D) фиброин/желатиновых матриксах мы наблюдали усиление экспрессии молекул адгезии ICAM-1 и VCAM-1, а также провоспалительных цитокинов TNF и IL-6 как на уровне мРНК, так и на уровне белка. Используя селективные ингибиторы внутриклеточных сигнальных путей, мы обнаружили значительную роль киназы JNK в индукции экспрессии молекул адгезии. При этом, экспрессия генов факторов *Ctgf* и *Fgf2*, способствующих развитию фиброза, была снижена в МЭФ, культивируемых на 3D матриксах. В результате мы обнаружили, что фиброин/желатиновые скаффолды имеют провоспалительную активность и препятствуют формированию фиброзной ткани, что также подтверждается данными *in vivo*. Так, подкожное введение трехмерных фиброин/желатиновых микрочастиц вызывало повышенную инфильтрацию миелоидных клеток, экспрессирующих Ly6C^{hi}, в кожу и снижение экспрессии *Ctgf* и *Fgf2*. Более того, фиброин/желатиновые микрочастицы способствовали заживлению в модели полнослойных ран кожи, ускоряли реэпителизацию и препятствовали развитию фиброза [4]. Поскольку фиброин/желатиновые матриксы обладают провоспалительными свойствами, мы предположили, что они могут быть использованы для биоинженерии третичной лимфоидной ткани *in vivo*, с помощью которой в дальнейшем будет возможно индуцировать специфический

иммунный ответ. Для проверки этой гипотезы была проведена имплантация фиброин/желатиновых матриксов под капсулу почки мышам с целью индуцировать рост сосудов и миграцию иммунных клеток в имплант [5]. В этой модели полная васкуляризация матриксов происходила примерно через 2 месяца после имплантации. При анализе имплантов мы обнаружили их значительную инфильтрацию Т- и В-лимфоцитами. Более того, были выявлены кластеры В-лимфоцитов, характерные для третичной лимфоидной ткани. Тем не менее, в имплантах отсутствовали ключевые для вторичных и третичных лимфоидных органов сигнатуры венул с высоким эндотелием (HEV) и фолликулярных дендритных клеток (FDC), что говорит о примитивности полученной лимфоидной ткани. Интересно, что имплантация фиброиновых матриксов, заселенных МЭФ, приводила к увеличению количества инфильтрирующих имплант лимфоцитов, что говорит о необходимости использования стромальных клеток в процессе биоинженерии лимфоидных органов.

Работа выполнена при поддержке программы фундаментальных исследований РАН «Фундаментальные исследования для биомедицинских технологий».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Smits AIPM, Bouten CVC. (2018) Tissue Engineering meets Immunoengineering: Prospective on Personalized In Situ Tissue Engineering Strategies. *Curr Opin Biomed Eng.*
2. Agapov I. I., Moisenovich M. M., Vasiljeva T. V., Pustovalova O. L., Kon'kov A. S., Arkhipova A. Y., Sokolova O. S., Bogush V. G., Sevastianov V. I., Debabov V. G., Kirpichnikov M. P. (2010) Biodegradable matrices from regenerated silk of *Bombix mori*. *Dokl Biochem Biophys.* 433,201–4.
3. Moisenovich M. M., Arkhipova A. Yu., Orlova A. A., Drutskaya M. S., Volkova S. V., Zacharov S. E., Agapov I. I., Kirpichnikov M. P. (2014) Composite Scaffolds Containing Silk Fibroin, Gelatin, and Hydroxyapatite for Bone Tissue Regeneration and 3D Cell Culturing. *Acta Naturae (English version)*. 2014. Т. 6. № 1. С. 96–101.
4. Nosenko M. A., Moysenovich A. M., Zvartsev R. V., Arkhipova A. Y., Zhdanova A. S., Agapov I. I., Vasilieva T. V., Bogush V. G., Debabov V. G., Nedospasov S. A., Moisenovich M. M., Drutskaya M. S. (2018) Novel biodegradable polymeric microparticles facilitate scarless wound healing by promoting re-epithelialization and inhibiting fibrosis. *Front Immunol.* 9,2851.
5. Shultz L. D., Goodwin N., Ishikawa F., Hosur V., Lyons B. L., Greiner D. L. (2014) Subcapsular transplantation of tissue in the kidney. *Cold Spring Harb Protoc.* 737–740.

**SILK-BASED BIOMATERIALS FOR MODULATION
OF IMMUNE RESPONSE**

© 2019 M. A. Nosenko^{1,2*}, A. Y. Arkhipova^{2,3}, K-S.N. Atretkhany^{1,2},
M. S. Drutskaya¹, S. A. Nedospasov^{1,2}, M. M. Moisenovich²

*E-mail: maxim-nosenko@yandex.ru

¹Engelhardt Institute of Molecular Biology of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia;

²Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia;

³Moscow Regional Research and Clinical Institute ("MONIKI"), Moscow, Russia

Received: 15.03.2019. Accepted: 01.04.2019

Biomaterials have recently been recognized for their potential use in regenerative medicine and tissue engineering, since they not only represent a scaffold for cell populations, but also can influence functionality of different cell types. In particular silk-based biomaterials (i.e. fibroin or spidroin) are of high interest, because they show prominent mechanistic features and have proregenerative potential. In our work we showed that composite fibroin/gelatin scaffolds induce moderate inflammation both *in vitro* and *in vivo* and this effect depends on the configuration of the matrices. In particular, culturing of Mouse Embryonic Fibroblasts (MEF) on three-dimensional (3D), but not two-dimensional (2D) fibroin/gelatin scaffolds resulted in overexpression of adhesion molecules ICAM-1 and VCAM-1 as well as proinflammatory cytokines TNF and IL-6. Moreover subcutaneous injection of fibroin/gelatin microparticles in mice lead to accumulation of inflammatory myeloid cells and acceleration of skin wound healing, while implantation of 3D fibroin/gelatin scaffolds under the kidney capsule promoted lymphocytes clusterization, resulting in generation of primitive lymphoid tissue. Altogether our data suggest immunomodulatory features of fibroin/gelatin scaffolds, which can be useful in tissue engineering and regenerative medicine.

Key words: fibroin, inflammation, bioengineering, regeneration, MEF, 3D scaffold

Authors:

Nosenko M. A., junior staff scientist at Engelhardt Institute of Molecular Biology of Russian Academy of Sciences; PhD student at immunology department biological faculty of Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia;

Arkhipova A. Y., PhD, lead researcher at biological faculty of Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia; senior scientist researcher at scientific research laboratory of Moscow Regional Research and Clinical Institute ("MONIKI") Moscow, Russia;

Atretkhany K-S.N., junior staff scientist at Engelhardt Institute of Molecular Biology of Russian Academy of Sciences; PhD student at immunology department biological faculty of Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia;

Drutskaya M. S., PhD, leading staff scientist at Engelhardt Institute of Molecular Biology of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia;

Nedospasov S. A., ✉ Academician of RAS, PhD, head of the lab at Engelhardt Institute of Molecular Biology of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia. E-mail: sergei.nedospasov@gmail.com;

Moisenovich M. M., PhD, head of the lab at biological faculty of Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia.

ФАКТОР НЕКРОЗА ОПУХОЛЕЙ В ЗАЖИВЛЕНИИ ПОЛНОСЛОЙНЫХ РАН КОЖИ У МЫШЕЙ

© 2019 г. М. А. Носенко^{1,2*}, С. Г. Амбарян^{1,2}, С. А. Недоспасов^{1,2},
М. С. Друзкая¹

*E-mail: maxim-nosenko@yandex.ru

¹Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта
Российской академии наук, Москва, Россия;

²Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия

Поступила: 15.03.2019. Принята: 26.03.2019

Изучение механизмов заживления ран кожи является крайне актуальной задачей для биомедицины, обусловленной необходимостью поиска новых подходов терапии хронически незаживающих ран, том числе связанных с развитием аутоиммунных патологий, а также для предотвращения образования фиброза. В последнее время появляется все больше данных, свидетельствующих о том, что провоспалительные цитокины, в первую очередь TNF, IL-6 и IL-1, играют ключевую роль в регуляции кожной регенерации. В этой работе была исследована роль фактора некроза опухолей (TNF) в регенерации полнослойных ран кожи у мышей с применением методов обратной генетики. Мы обнаружили, что специфическое удаление TNF только в макрофагах с использованием кондиционного нокаута приводит к замедленной динамике заживления полнослойных ран кожи. При этом генетическая инактивация TNF во всех типах клеток (полный нокаут) не приводит к задержке в динамике заживления ран кожи и сравнима с мышами дикого типа. Интересно, что генетическое удаление одного из рецепторов TNF — TNFR1, наоборот ускоряет закрытие ран кожи. Таким образом, результаты нашего исследования свидетельствуют о том, что TNF из разных типов клеток играет разнонаправленную роль в заживлении ран кожи у мышей, что, по-видимому, определяется как его клеточным источником, так и типом рецептора на целевых клетках.

Ключевые слова: регенерация, полнослойная рана кожи, TNF, TNFR1, фиброз, макрофаги

DOI: 10.31857/S102872210006641-0

Адрес: 119991 Москва, ул. Вавилова 32, ФГБУН «Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта Российской академии наук», лаборатория молекулярных механизмов иммунитета, Недоспасов Сергей Артурович.
Тел.: +7 499 135 23 11 (раб.).

E-mail: sergei.nedospasov@gmail.com

Авторы:

Носенко М. А., младший научный сотрудник лаборатории молекулярных механизмов иммунитета Института молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН; аспирант кафедры иммунологии биологического факультета МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия;

Амбарян С. Г., лаборант-исследователь лаборатории молекулярных механизмов иммунитета Института молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН; магистр кафедры иммунологии биологического факультета МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия;

Недоспасов С. А., акад., проф., д.б.н., заведующий лабораторией молекулярных механизмов иммунитета Института молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН; заведующий кафедрой иммунологии биологического факультета МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия;

Друзкая М. С., к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярных механизмов иммунитета Института молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия.

Заживление кожи можно разделить на несколько стадий: образование кровяного сгустка, воспаление, пролиферация и ремоделирование [1]. Провоспалительные цитокины высоко экспрессируются уже на первом этапе, обеспечивая защиту от патогенов, способствуя привлечению иммунных клеток в сайт повреждения и переходу на этап воспаления. В дальнейшем некоторые из этих цитокинов, в том числе TNF, играют важную роль в запуске реэпителизации раны и восстановлении придатков кожи, что подтверждается в экспериментах на мышцах с генетической инактивацией этих факторов [2, 3]. Однако детальные механизмы, в том числе кле-

точные источники цитокинов, участвующие в заживлении кожи, не до конца изучены. Помимо этого значительная часть данных о роли цитокинов в кожной регенерации получена с использованием мышей, которые, однако, имеют принципиальную особенность в способе заживления кожи. У мышей, в отличие от человека, имеется подкожная мышца, которая после повреждения кожи обеспечивает быструю контракцию раны и заживление в течение нескольких дней [4]. Чтобы преодолеть это различие, была разработана мышьяная модель полнослойных ран кожи, в которой раны дополнительно фиксируются силиконовыми кольцами, что позволяет получить более релевантную для человека динамику заживления [5]. Применяя эту экспериментальную модель на мышах с полной или тканеспецифической генетической инактивацией TNF, мы показали, что TNF, производимый макрофагами, важен для заживления кожи. Интересно, что в наших экспериментах полный нокаут TNF не показывает задержки в кожной регенерации, что не согласуется с опубликованными данными на другой модели ран кожи без силиконовых колец [3]. Это, с одной стороны, может отражать вовлеченность TNF в процесс контракции раны у грызунов, а с другой стороны, может свидетельствовать о двойной роли TNF собственно в заживлении полнослойных

ран кожи. В подтверждение этого, генетическое удаление TNFR1 также приводит к ускорению кожной регенерации. Дальнейшие исследования с использованием тканеспецифических нокаутов TNF и его рецепторов необходимы, чтобы установить детальный механизм действия этого цитокина в процессе заживления полнослойных ран кожи.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 19-04-01094.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Landén N. X., Li D., Ståhle M. (2016) Transition from inflammation to proliferation: a critical step during wound healing. *Cell Mol Life Sci.* 73,3861–3885.
2. Gallucci R. M., Simeonova P. P., Matheson J. M., Kommineni C., Gurjel J. L., Sugawara T., Luster M. I. (2000) Impaired cutaneous wound healing in interleukin-6-deficient and immunosuppressed mice. *FASEB J.* 14,2525–2531.
3. Shinozaki M., Okada Y., Kitano A., Ikeda K., Saika S., Shinozaki M. (2009) Impaired cutaneous wound healing with excess granulation tissue formation in TNF α -null mice. *Arch Dermatol Res.* 301,531–537.
4. Ansell D. M., Holden K. A., Hardman M. J. (2012) Animal models of wound repair: Are they cutting it? *Exp Dermatol.* 21,581–585.
5. Wang X., Ge J., Tredget E. E., Wu Y. (2013) The mouse excisional wound splinting model, including applications for stem cell transplantation. *Nat Protoc.* 8,302–309.

TUMOR NECROSIS FACTOR IN REGENERATION OF DEEP SKIN WOUNDS IN MICE

© 2019 M. A. Nosenko^{1,2*}, S. G. Ambaryan², S. A. Nedospasov^{1,2}, M. S. Drutskaya¹

*E-mail: maxim-nosenko@yandex.ru

¹Engelhardt Institute of Molecular Biology of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia;

²Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Received: 15.03.2019. Accepted: 26.03.2019

Mechanisms of skin wound healing have been extensively studied in order to propose novel approaches for treatment of chronic and poorly healing wounds, including those associated with autoimmune pathologies, as well as for fibrosis prevention. Recent studies indicate the key role of proinflammatory cytokines, such as TNF, IL-6 and IL-1, in regulating skin regeneration. In our work we investigated the impact of tumor necrosis factor (TNF) on healing of deep skin wounds in mice by employing reverse genetics approach. We found, that conditional knock-out of TNF gene specifically in macrophages results in delayed wound healing. However inactivation of TNF in all cell types does not affect wound regeneration dynamics. Moreover, genetic knock-out of TNF receptor I (TNFR1) results in accelerated wound healing. Thus, the results of our study suggest that TNF from different cell types plays a dual role in skin regeneration probably reflecting that both cellular source of TNF as well as receptor type on target cells are important.

Key words: regeneration, deep skin wound, TNF, TNFR1, fibrosis, macrophages

Authors:

Nosenko M. A., junior staff scientist at Engelhardt Institute of Molecular Biology of Russian Academy of Sciences; PhD student at immunology department biological faculty of Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia;

Ambaryan S. G., master student at Engelhardt Institute of Molecular Biology of Russian Academy of Sciences and at immunology department biological faculty of Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia;

Nedospasov S. A., ✉ Academician of RAS, PhD, head of the lab at Engelhardt Institute of Molecular Biology of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia. **E-mail:** sergei.nedospasov@gmail.com;

Drutskaya M. S., PhD, leading staff scientist at Engelhardt Institute of Molecular Biology of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia.

КЛИНИКО-ИММУНОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МИЛИАЦИЛА И КВЧ-ТЕРАПИИ ПРИ ЛЕЧЕНИИ ГНОЙНЫХ РАН У БОЛЬНЫХ С САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ

© 2019 г. О. Б. Нузова^{1*}, А. В. Студеникин², Ю. В. Филиппова¹,
А. А. Стадников¹

*E-mail: nuzova_27@mail.ru

¹ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет»

Минздрава России, Оренбург, Россия;

²ГБУЗ «Оренбургская областная клиническая больница» Минздрава России, Оренбург, Россия

Поступила: 26.02.2019. Принята: 12.03.2019

Цель исследования – оценка эффективности лечения гнойных ран при местном сочетанном использовании милиацила и КВЧ-терапии у больных с сахарным диабетом на основе определения содержания цитокинов. У 35 больных основной группы в местном лечении ран использовали милиацил и КВЧ-терапию, у 35 больных контрольной группы применяли только милиацил и определяли уровень ФНО α , ИФН γ , ИЛ-4, ИЛ-10 в сыворотке крови при поступлении в стационар, на 7-й день и по окончании лечения. В результате проведенного лечения у пациентов основной группы наблюдали более выраженное увеличение уровня цитокинов (ИФН γ , ИЛ-4) и их снижение (ИЛ-10, ФНО α) по сравнению с пациентами контрольной группы. Определена эффективность лечения гнойных ран у больных с сахарным диабетом при местном использовании милиацила и КВЧ-терапии на основе определения содержания цитокинов.

Ключевые слова: милиацил, гнойные раны, сахарный диабет

DOI: 10.31857/S102872210006639-7

Адрес: 460000 Оренбург, ул. Советская 6, ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» Минздрава России, кафедра факультетской хирургии, Нузова Ольга Борисовна.

Тел./факс: +7 (3532) 500620, 8 905 894 50 06 (моб.).

E-mail: nuzova_27@mail.ru

Авторы:

Нузова О. Б., д.м.н., профессор кафедры факультетской хирургии ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, Оренбург, Россия;

Студеникин А. В., к.м.н., врач-хирург хирургического отделения ГБУЗ «Оренбургская областная клиническая больница» Минздрава России, Оренбург, Россия;

Филиппова Ю. В., к.м.н., научный сотрудник проблемной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, Оренбург, Россия;

Стадников А. А., д.б.н., профессор, Заслуженный деятель науки РФ, заведующий кафедрой гистологии, цитологии и эмбриологии ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» Минздрава России, Оренбург, Россия.

Успех лечения больных с гнойной хирургической инфекцией во многом зависит от мест-

ного лечения. Механизм патогенеза сахарного диабета сложен, а по данным последних исследований в его формировании все большую роль отводят участию цитокинов [1]. В ранее проведенных работах было показано положительное действие милиацила в лечении гнойных ран [2, 3]. Многонаправленным воздействием на течение раневого процесса обладает также КВЧ-терапия.

Цель исследования – оценка эффективности лечения гнойных ран при местном сочетанном использовании милиацила и КВЧ-терапии у больных с сахарным диабетом на основе определения содержания цитокинов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клинические исследования охватывали 70 больных с гнойными ранами на фоне сахарного диабета. У 35 больных основной группы в местном лечении ран использовали сочетанное местное применение милиацила и КВЧ-тера-

пии, 35 больных контрольной группы использовали только милиацил. Исследование уровней ФНО α , ИФН γ , ИЛ-4, ИЛ-10 в сыворотке крови больных всех групп проведено методом ИФА с использованием наборов фирмы «Цитокин» (Санкт-Петербург) при поступлении в стационар, на 7-й день и по окончании лечения. Полученные данные были обработаны с помощью программы «Статистика 6.1».

РЕЗУЛЬТАТЫ

При использовании милиацила и КВЧ-терапии в лечении гнойных ран в большинстве наблюдений раны заживали на $13,4 \pm 0,21$ день, у пациентов контрольной группы на $18,1 \pm 0,21$ день. Уровень ИЛ-4 у пациентов основной группы составлял при поступлении $3,95 \pm 0,18$ пг/мл (при норме $3,35 \pm 0,40$), у пациентов контрольной группы – $5,15 \pm 0,47$ пг/мл. На 7 день лечения у пациентов основной группы содержание ИЛ-4 увеличилось до $4,53 \pm 0,2$ пг/мл, а у больных контрольной группы до $5,56 \pm 0,34$ пг/мл. По окончании лечения у пациентов основной группы уровень ИЛ-4 увеличился до $13,65 \pm 0,48$ пг/мл (в 3,5 раза), а у больных контрольной группы до $10,81 \pm 0,64$ пг/мл (в 2,1 раза).

Уровень ИЛ-10 у пациентов основной группы составлял при поступлении $33,37 \pm 1,03$ пг/мл (при норме $7,70 \pm 0,60$), у пациентов контрольной группы – $32,11 \pm 1,48$ пг/мл. На 7 день лечения у пациентов основной группы уровень ИЛ-10 увеличился до $46,64 \pm 1,57$ пг/мл, а у больных контрольной группы до $47,73 \pm 1,27$ пг/мл. По окончании лечения у пациентов основной группы содержание ИЛ-10 снизилось до $10,12 \pm 0,18$ пг/мл (в 3,3 раза), а у больных контрольной группы до $13,5 \pm 0,3$ пг/мл (в 2,4 раза).

У пациентов основной группы уровень ФНО α составлял при поступлении $8,71 \pm 0,51$ пг/мл (при норме $3,81 \pm 0,34$), у пациентов контрольной группы – $9,86 \pm 0,54$ пг/мл. На 7 день лечения у пациентов основной группы уровень ФНО α снизился до $7,17 \pm 0,46$ пг/мл, а у больных контрольной группы до $8,71 \pm 0,46$ пг/мл. По окончании лечения у пациентов основной группы уровень ФНО α составил $4,20 \pm 0,09$ пг/мл (уменьшился в 2,1 раза), а у больных контрольной группы $5,41 \pm 0,19$ пг/мл (снизился в 1,8 раза).

Уровень ИФН γ у пациентов основной группы составлял при поступлении $5,74 \pm 0,32$ пг/мл (при норме $24,32 \pm 3,37$), у пациентов контрольной группы – $5,31 \pm 0,32$ пг/мл. На 7 день лечения у пациентов основной группы уровень ИФН γ увеличился до $19,27 \pm 0,46$ пг/мл, а у больных контрольной группы до $15,79 \pm 0,42$ пг/мл. По окончании лечения у пациентов основной группы уровень ИФН γ сохранялся высоким $21,15 \pm 0,73$ пг/мл (увеличился в 3,7 раза), у больных контрольной группы $17,82 \pm 0,3$ пг/мл (повысился в 3,4 раза).

ВЫВОДЫ

В результате проведенного лечения у пациентов основной группы наблюдали более выраженное увеличение уровня цитокинов (ИФН γ , ИЛ-4) и снижение содержания цитокинов (ИЛ-10, ФНО α), по сравнению с пациентами контрольной группы. Обоснована эффективность лечения гнойных ран у больных с сахарным диабетом при местном использовании милиацила и КВЧ-терапии на основе определения содержания цитокинов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Кравчун Н. А., Чернявская И. В. Особенности цитокинового профиля у больных с сахарным диабетом 2-го типа в сочетании с аутоиммунным тиреоидитом. Клиницист. 2, 2014, 22–28. [Kravchun N. A., Chernyavskaya I. V. Features of the cytokine profile in patients with type 2 diabetes mellitus in combination with autoimmune thyroiditis. Clinician. 2, 2014, 22–28.]
2. Нузова О. Б. Лечение трофических язв нижних конечностей милиацилом и магнитолазеротерапией. Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова. 2008, 3, 30–33. [Nuzova O. B. Treatment of trophic ulcers of the lower extremities with miliacil and magnetic laser therapy. Surgery. Journal named after N.I. Pirogov. 2008, 3, 30–33.]
3. Нузова О. Б., Стадников А. А., Нузов Б. Г. Реорганизация эпителиальных и соединительнотканых структур трофических язв нижних конечностей под действием различных способов местного лечения. Морфология. 2008, 2; 133, 97. [Nuzova O. B., Stadnikov A. A., Nuzov B. G. Reorganization of the epithelial and connective tissue structures of trophic ulcers of the lower extremities under the influence of various methods of local treatment. Morphology. 2008, 2; 133, 97.]

**CLINICAL AND IMMUNOLOGICAL EVALUATION OF THE EFFECT
OF USING MILIACIL AND EHF-THERAPY IN THE TREATMENT
OF PURULENT WOUNDS IN PATIENTS WITH DIABETES**

© 2019 O. B. Nuzova^{1*}, A. V. Studenikin², Yu. V. Filippova¹,
A. A. Stadnikov¹

*E-mail: nuzova_27@mail.ru

¹Orenburg State Medical University of the Ministry of Health of Russia, Orenburg, Russia;

²Orenburg Regional Clinical Hospital of the Ministry of Health of Russia, Orenburg, Russia

Received: 26.02.2019. **Accepted:** 12.03.2019

The purpose of the study is to evaluate the effectiveness of purulent wounds treatment with the local combined use of Miliacile and EHF-therapy in patients with diabetes mellitus, based on determining the cytokine content. In 35 patients of the main group, Miliacile and EHF therapy were used in the local treatment of wounds, while in 35 patients of the control group, only Miliacile was used and the levels of TNF α , IFN γ , IL-4, IL-10 were determined in the blood serum of these patients upon admission to hospital, on the 7th day and at the end of treatment. As a result of treatment, there was observed a more pronounced increase in the level of cytokines (IFN γ , IL-4) and their decrease (IL-10, TNF α) in the patients of the main group as compared with patients of the control group. The effectiveness of purulent wounds treatment in patients with diabetes mellitus with the local use of Miliacile and EHF-therapy based on the determination of cytokine levels was determined.

Key words: Miliacile, purulent wounds, diabetes mellitus, cytokine

Authors:

Nuzova O. B., ✉ Doctor of Medicine, Professor of the Department of Faculty Surgery of the Orenburg State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Orenburg, Russia. E-mail: nuzova_27@mail.ru;

Studenikin A. V., Candidate of Medicine, surgeon of the surgery department of the Orenburg Regional Clinical Hospital of the Ministry of Health of Russia, Orenburg, Russia;

Filippova Yu. V., Candidate of Medicine, research worker, Problem Research Laboratory of the Orenburg State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Orenburg, Russia;

Stadnikov A. A., Doctor of Biology, Professor, Honored Scientist of the Russian Federation, Head of the Department of Histology, Cytology and Embryology of the Orenburg State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Orenburg, Russia.

БЕСПЛОДИЕ ТРУБНОГО ГЕНЕЗА: ИММУННЫЕ И МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ НАРУШЕНИЯ НА СИСТЕМНОМ И МЕСТНОМ УРОВНЕ

© 2019 г. Ж. П. Омашарифа, А. А. Конопля*

*E-mail: alex-kanabis@yandex.ru

ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет»

Минздрава РФ, Курск, Россия

Поступила: 28.02.2019. Принята: 15.03.2019

В исследование включались пациентки в возрасте 18–40 лет с отягощенным акушерско-гинекологическим анамнезом (хронические воспалительные заболевания органов малого таза, бесплодие в анамнезе, самопроизвольные выкидыши, невынашивание беременности, аборт). У пациенток с трубным бесплодием имеет место нарушение целого ряда показателей иммунного статуса как на системном, так и на местном уровне, развивается «окислительный стресс», что проявляется нарушением процессов перекисного окисления липидов. Выявленные нарушения иммунного и метаболического статусов недостаточно полно корригируются стандартной схемой лечения, что требует включения в схему лечения данных пациенток дополнительно иммуномодулирующих препаратов.

Ключевые слова: бесплодие, иммунные нарушения, сальпингоофорит

DOI: 10.31857/S102872210006638-6

Адрес: 305041, г. Курск, ул. К. Маркса, 3, ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» Минздрава России, кафедра акушерства и гинекологии ФПО, По Омашарифа Бинти Жамал. Тел.: 8 915 514-38-33 (моб.).

E-mail: alex-kanabis@yandex.ru

Авторы:

Омашарифа Ж. П., ассистент кафедры акушерства и гинекологии ФПО ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» Минздрава России, Курск, Россия;

Конопля А. А., д.м.н., профессор кафедры акушерства и гинекологии ФПО ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» Минздрава России, Курск, Россия.

На фоне хронического воспалительного процесса органов малого таза у женщин, сопровождающихся вовлечением в патогенез иммунных механизмов поддержания гомеостаза, высока частота возникновения спаек, что является причиной возникновения вторичного бесплодия, требующего использования хирургических методов коррекции [1–4].

Цель исследования — установление иммунных и метаболических нарушений на системном и местном уровне у пациенток при бесплодии трубного генеза на фоне стандартного лечения.

ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ МЕТОДЫ

В исследование включались пациентки в возрасте 18–40 лет с верифицированным диагнозом — хронический сальпингоофорит в стадии ремиссии и длительностью анамнеза не более 10 лет. Контрольную группу составили здоровые женщины того же возраста. Интенсивность процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) оценивали по содержанию в плазме крови и вагинально-цервикальном смыве ацилгидроперекисей и малонового диальдегида (АГП, МДА) с помощью набора «ТБК-Агат», состояние антиоксидантной системы — по общей антиокислительной активности (ОАА) и активности супероксиддисмутазы (СОД). С применением коммерческих наборов для твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) определяли уровень стабильных метаболитов оксида азота (SM_{ON}), неоптерина, С-реактивного белка (СРБ). Цитокины (TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IFN γ , IL-2, IL-17, IL-18, G-CSF, IL-4, IL-10, IL-1RA), IgM, IgG, IgA и sIgA (в смыве) выявляли методом ИФА с использованием наборов ЗАО «Вектор-

Бест» (Россия), компоненты системы комплемента (C_3 , C_{3a} , C_4 , C_5 , C_{5a}) и фактор Н – диагностическим набором ООО «Цитокин» (Россия). Активность C_1 -ингибитора определяли хромогенным методом по способности ингибировать C_1 -эстеразу. С помощью пакета компьютерной программы Statistica 8 проводили статистическую обработку результатов путем вычисления медианы (Me) с межквартильным интервалом (P25; P75). Существенность различий оценивали по U-критерию. Статистически значимыми считали различия с $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При поступлении в клинику у пациенток с трубным бесплодием в плазме крови повышен уровень $IFN\gamma$, G-CSF, провоспалительных (TNF α , IL-1 β , IL-8, IL-18), противовоспалительных (IL-4, IL-10) цитокинов, компонентов системы комплемента, IgM и снижена концентрация IgG и IgA. Применение стандартной схемы лечения позволило у данной категории пациенток нормализовать уровень IgG, повысить содержание противовоспалительных цитокинов и скорректировать, но не до значений доноров, концентрацию провоспалительных цитокинов, C_3 , C_{5a} , C_1 -инг, Ig M.

До лечения у пациенток с трубным бесплодием в плазме крови повышен уровень продуктов ПОЛ (МДА и АГП), неоптерина, SM_{NO} , СРБ и снижена активность СОД и ОАА. Применение стандартной схемы лечения позволило у данной категории пациенток скорректировать концентрацию продуктов ПОЛ, SM_{NO} , СРБ, но не до уровня нормы.

В вагинально-цервикальном смыве при поступлении в клинику у пациенток с трубным бесплодием в плазме крови повышено содержание провоспалительных цитокинов, но в отличие от системного уровня, снижена концентрация противовоспалительных цитокинов, повышена активность системы комплемента, концентрация sIgA, МДА, SM_{NO} . Применение стандартной схемы лечения позволило у данной категории пациенток скорректировать уровень sIgA, но при этом еще больше увеличилась концентрация IL-8 и C_3 -компонента системы комплемента.

Сравнивая суммарно количество отличных показателей от уровня нормы у больных с труб-

ным бесплодием выявлено, что если до лечения таких показателей было 97,2% от изученных, то на фоне стандартной фармакотерапии снижается процент таких показателей до 94,5%, что явно недостаточно, при этом почти половина показателей скорректировалась, но не до уровня нормы.

Таким образом, у больных трубным бесплодием имеет место нарушение целого ряда показателей иммунного статуса на системном и локальном уровне, развивается «окислительный стресс», что проявляется нарушением процессов ПОЛ, выявленные нарушения недостаточно полно корректируются стандартной схемой лечения, что требует включения в схему лечения данных пациенток дополнительно иммунотропных препаратов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Конопля А. А., Караулов А. В., Конопля А. И., Гаврилюк В. П. Взаимосвязь коррекции иммунных и оксидантных нарушений со структурно-функциональными свойствами эритроцитов при хронических сальпингоофоритах. Курск: Изд-во ГОУ ВПО КГМУ Росздрава. 2009. 180. [Konoplya A. A., Karaulov A. V., Konoplya A. I., Gavriilyuk V. P. Interrelation of correction of immune and oxidative disturbances with structural-functional properties of erythrocytes at chronic salpingo-ophorites. Kursk: Izd-vo GOU VPO KGMU Roszdrava. 2009, 180]
2. Конопля А. А., Газазян М. Г., Караулов А. В. Применение иммуномодуляторов в комплексном лечении хронического сальпингоофорита. Акушерство и гинекология. 2010, 4, 75–78. [Konoplya A. A., Gazazyan M. G., Karaulov A. V. The use of immunomodulators in complex treatment of chronic salpingoophoritis. Obstetrics and gynecology. 2010, 4, 75–78]
3. Сухих Г. Т., Шуршалина А. В. Хронический эндометрит: руководство. М.: ГЭОТАР-Медиа. 2013, 64. [Sukhikh G. T., Shurshalina A. V. Chronic endometritis: a guide. M.: GEOTAR-Media. 2013, 64].
4. Зорина В. Н., Лихачева В. В., Зорина Р. М., Баженова Л. Г., Третьякова Т. В., Архипова С. В., Ренге Л. В., Зорин Н. А. Дисбаланс в системе «Цитокиновая сеть – регуляторно-транспортные белки» при различных видах бесплодия в программах экстракорпорального оплодотворения. Медицинская иммунология. 2018, 20(2), 203–214. [Zorina V. N., Likhacheva V. V., Zorina R. M., Bazhenova L. G., Tret'yakova T. V., Arkhipova S. V., Renge L. V., Zorin N. A. Imbalance in the system "Cytokine network-regulatory transport proteins" in various types of infertility in *in vitro* fertilization programs. Medical immunology. 2018, 20 (2), 203–214]

INFERTILITY OF PIPE GENESIS: IMMUNE AND METABOLIC DISORDERS AT THE SYSTEM AND LOCAL LEVEL

© 2019 B. G. Omasharifa Po, A. Ф. Konoplya*

*E-mail: alex-kanabis@yandex.ru

Kursk State Medical University, Kursk, Russia

Received: 28.02.2019. Accepted: 15.03.2019

The study included patients aged 18–40 years with a burdened obstetric and gynecological history (chronic pelvic inflammatory diseases, history of infertility, spontaneous abortions, miscarriage, abortions). In patients with tubal infertility, there is a violation of a number of indicators of immune status, both at the system level and at the local level, «oxidative stress» develops, which is manifested in the violation of lipid peroxidation processes. The revealed violations of the immune and metabolic statuses are not fully corrected by the standard treatment regimen, which requires the inclusion of additional immunotropic drugs in the treatment regimen of these patients.

Key words: infertility, immune disorders, salpingoophoritis

Authors:

Omasharifa ZH.P., Assistant of the Department of Obstetrics and Gynecology of Kursk State Medical University, Kursk, Russia;

Konoplya A.A., ✉ MD, Professor of the Department of Obstetrics and Gynecology of Kursk State Medical University, Kursk, Russia. **E-mail:** alex-kanabis@yandex.ru

ВЛИЯНИЕ ВИТАМИНА D3 В СОСТАВЕ РЕКТАЛЬНЫХ СУППОЗИТОРИЕВ НА КОНЦЕНТРАЦИЮ IgG, IgM И IL-8 В СЫВОРОТКЕ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ЯЗВЕННОМ КОЛИТЕ

© 2019 г. М. В. Осиков, Е. В. Симонян, М. С. Бойко*

*E-mail: ri-tochka9@list.ru

ФГБОУ ВО «Южно-Уральский Государственный Медицинский Университет»
Минздрава РФ, Челябинск, Россия

Поступила: 14.03.2019. Принята: 27.03.2019

Использование для базисной терапии язвенного колита (ЯК) противовоспалительных средств (5-аминосалициловой кислоты (5-АСК), глюкокортикоидов) ограничено широким спектром побочных эффектов. Цель работы – изучить влияние ректальных суппозиторий оригинального состава с витамином D3 на концентрацию в сыворотке IgG, IgM и IL-8 при экспериментальном ЯК. Работа выполнена на 70 белых крысах линии Wistar, ЯК моделировали двухэтапным введением 3% оксазолон, витамин D3 в составе ректальных суппозиторий оригинального состава на основе полиэтиленгликоля применяли каждые 12 часов, в группе сравнения применяли ректальные суппозитории с 5-АСК. Концентрацию в сыворотке IL-8, IgG и IgM определяли с помощью специфических тест-систем для крыс на иммуоферментном анализаторе на 2, 4 и 6 сутки эксперимента. Установлено, что при экспериментальном оксазолон-индуцированном язвенном колите в сыворотке крыс увеличивается концентрация IL-8, IgG и IgM на 2, 4 и 6 сутки эксперимента. Применение витамина D3 в составе ректальных суппозиторий оригинального состава ежедневно с интервалом в 12 ч при экспериментальном ЯК приводит к снижению концентрации IL-8 на 6 сутки, а концентрации IgG и IgM – на 4 и 6 сутки наблюдения.

Ключевые слова: язвенный колит, IgG, IgM, интерлейкин-8, витамин D3, ректальные суппозитории

DOI: 10.31857/S102872210006574-6

Адрес: 454092 Челябинск, ул. Воровского, д. 64, ФГБОУ ВО «Южно-Уральский Государственный Медицинский Университет» Минздрава РФ, Челябинск, Россия; Бойко Маргарита Сергеевна. Тел.: 8 919 127 91 23

E-mail: ri-tochka9@list.ru

Авторы:

Осиков М. В., д.м.н., профессор, заведующий кафедрой патофизиологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, Челябинск, Россия;

Симонян Е. В., к.фарм.н., доцент, заведующая кафедрой химии и фармации фармацевтического факультета ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, Челябинск, Россия;

Бойко М. С., ассистент кафедры патофизиологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, Челябинск, Россия.

АКТУАЛЬНОСТЬ

В настоящее время для базисной терапии язвенного колита (ЯК) применяют производные

5-аминосалициловой кислоты (5-АСК) и глюкокортикостероиды, обладающих широким спектром побочного действия и ограниченной переносимостью при длительном применении, в связи с чем необходим поиск новых терапевтических подходов. В этом отношении интерес представляет витамин D3, обладающий плеiotропным действием, его положительный эффект был описан при сахарном диабете I типа, ревматоидном артрите и других аутоиммунных заболеваниях [1]. В патогенезе поражения слизистой оболочки толстого кишечника при ЯК имеют значение активация фагоцитов при участии IL-8, а также Th2-зависимые реакции с увеличением продукции IgM и IgG [2].

Цель работы – изучить влияние ректальных суппозиторий оригинального состава с витамином D3 на концентрацию в сыворотке IgG, IgM и IL-8 при экспериментальном ЯК.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа выполнена на 70 белых крысах линии Wistar массой 240–260 г. Сформировано 4 группы: I (n=7) – интактный контроль; II (n=21) – животные с ЯК; III (n=21) – животные с ЯК в условиях применения каждые 12 часов ректальных суппозиторий с 5-АСК; IV (n=21) – животные с ЯК в условиях применения каждые 12 часов ректальных суппозиторий на основе полиэтиленгликоля с 10% водным раствором витамина D3 оригинального состава (тема охраноспособна). ЯК моделировали двухэтапным введением 3% оксазолон («Sigma-aldrich», USA). Исследования проводили на 2, 4 и 6 сутки. Концентрацию в сыворотке ИЛ-8, IgG и IgM определяли с помощью специфических тест-систем для крыс фирмы «ELISA Kit» (Китай) на автоматическом иммуноферментном анализаторе «Personal LAB» (Италия). Данные обрабатывали с помощью пакета программ «Statistica 10.0 for Windows». Отличия между группами считали статистически значимыми при $p < 0,05$ с использованием непараметрических критериев Краскелла-Манна-Уитни, Вальда Вольфовитца, Колмогорова-Смирнова.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Установлено, что при экспериментальном ЯК концентрация в сыворотке IgM возрастает на 2, 4, 6 сутки наблюдения и достигает максимальных значений на 6 сутки ($34,21 \pm 1,39$ г/л; контроль $12,71 \pm 1,72$ г/л; $p < 0,05$), концентрация IgG в сыворотке возрастает на 2, 4 и 6 сутки наблюдения с максимумом на 4 сутки ($11,69 \pm 8,99$ г/л; контроль $3,23 \pm 1,04$ г/л; $p < 0,05$). Содержание в сыворотке ИЛ-8 при ЯК увеличивается на 2, 4 и 6 сутки наблюдения с максимальным уровнем на 2 сутки ($311,62 \pm 20,98$ пг/мл; контроль $88,51 \pm 1,02$ пг/мл; $p < 0,05$).

Применение базисной терапии – ректальных суппозиторий с 5-АСК при экспериментальном ЯК приводит к снижению концентрации в сыворотке IgM на 2, 4 и 6 сутки с максимальной выраженностью эффекта на 6 сутки наблюдения ($20,81 \pm 0,39$ г/л; контроль $12,71 \pm 1,72$ г/л; $p < 0,05$), концентрация IgG в сыворотке снижается на 2, 4 и 6 сутки наблюдения с максимальной выраженностью эффекта на 6 сутки эксперимента ($6,32 \pm 0,94$ г/л; контроль $3,23 \pm 1,04$ г/л; $p < 0,05$). Уровень в сыворотке ИЛ-8 при использовании ректальных суппозиторий снижается на 2, 4 и 6 сутки эксперимента, с максимальной

выраженностью эффекта на 2 сутки эксперимента ($70,47 \pm 10,44$ пг/мл; контроль $88,51 \pm 1,02$ пг/мл, $p < 0,05$). Отметим, что концентрация IgG достигает значений интактных животных на 6 сутки эксперимента, ИЛ-8 – на 2, 4 и 6 сутки.

Нами разработан состав и проведен комплекс фармакотехнологических исследований новой лекарственной формы с витамином D3 – ректальных суппозиторий (тема охраноспособна, подана заявка на изобретение). Применение у крыс ректальных суппозиторий с витамином D3 приводит к снижению концентрации в сыворотке IgM на 4 и 6 сутки наблюдения с максимальным эффектом на 6 сутки ($20,46 \pm 2,584$ г/л; контроль $12,71 \pm 1,72$ г/л, $p < 0,05$). Концентрация IgG в сыворотке снижается на 4 и 6 сутки, с максимальным эффектом на 4 сутки эксперимента ($5,26 \pm 1,19$ г/л; контроль $3,23 \pm 1,04$ г/л, $p < 0,05$). Концентрация ИЛ-8 снижается только на 6 сутки эксперимента. Обнаруженные нами при экспериментальном ЯК изменения иммунного статуса подтверждают данные литературы о роли Th2-зависимых реакций в повреждении стенки кишечника с участием IgM, IgG, а также значении активации фагоцитирующих клеток и увеличения продукции ИЛ-8 – мощного хемоаттрактанта, стимулятора поглотительной и киллинговой активности нейтрофилов, моноцитов, макрофагов. Продемонстрированы известные противовоспалительные свойства 5-АСК при ЯК в составе ректальных суппозиторий за счет ингибирования синтеза ИЛ-8, что приводит к снижению синтеза свободных радикалов и метаболитов арахидоновой кислоты (особенно лейкотриенов), тормозит миграцию и деструктивные функции фагоцитов. Впервые установлены иммуностропные эффекты локального применения витамина D3 в составе ректальных суппозиторий при экспериментальном ЯК в виде снижения концентрации в сыворотке IgM, IgG, ИЛ-8, что косвенно свидетельствует об иммуномодулирующем и противовоспалительном действии витамина D3, сопоставимых с таковыми при локальном введении 5-АСК и являются предпосылкой для проведения дальнейших исследований по изучению эффективности применения витамина D3 при ЯК.

ВЫВОДЫ

1. При экспериментальном оксазолон-индуцированном язвенном колите в сыворотке крыс увеличивается концентрация ИЛ-8, IgG и IgM на 2, 4 и 6 сутки эксперимента.

2. Применение витамина D3 в составе ректальных суппозиторий оригинального состава ежедневно с интервалом в 12 ч при экспериментальном язвенном колите приводит к снижению концентрации IL-8 на 6 сутки, а концентрации IgG и IgM – на 4 и 6 сутки наблюдения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. *Снопов С. А.* Механизмы действия витамина d на иммунную систему // Медицинская иммунология, 2014, Т. 16, № 6, 499–530. [*Snopov S. A.* Mechanisms of action of vitamin d on the immune system // Medical immunology, 2014, vol. 16, No. 6, 499–530].
2. *Toshifumi HIBI.* Pathogenesis and Treatment of Ulcerative Colitis // Journal of the Japan Medical Association (Vol. 46, No. 6, 2003, 257–262).

THE INFLUENCE OF VITAMIN D3 AS PART OF A NEW DOSAGE FORM FOR IgG, IgM, IL-8 IN BLOOD SERUM IN EXPERIMENTAL ULCERATIVE COLITIS

© 2019 M. V. Osikov, E. V. Simonyan, M. S. Boyko*

*E-mail: ri-tochka9@list.ru

South Ural State Medical University, Ministry of health of the Russian Federation, Chelyabinsk, Russia

Received: 14.03.2019. Accepted: 27.03.2019

The use of anti-inflammatory drugs for the basic therapy of ulcerative colitis (UC) (5-aminosalicylic acid (5-ASA), glucocorticoids) is limited to a wide range of side effects. The aim of the work is to study the effect of rectal suppositories of the original composition with vitamin D3 on the serum concentration of IgG, IgM and IL-8 in experimental UC. The work was performed on 70 white rats of the Wistar line, UC was modeled by two-stage administration of 3% oxazolone, vitamin D3 in the rectal suppositories of the original polyethylene glycol composition was used every 12 hours, in the comparison group rectal suppositories with 5-ASC were used. Serum concentrations of IL-8, IgG and IgM were determined using specific test systems for rats on an immunoassay analyzer on days 2, 4 and 6 of the experiment. It was established that in experimental oxazolone-induced ulcerative colitis in the serum of rats, the concentration of IL-8, IgG and IgM increases on days 2, 4 and 6 of the experiment. The use of vitamin D3 in the composition of rectal suppositories of the original composition daily with an interval of 12 hours with experimental UC leads to a decrease in the concentration of IL-8 for 6 days, and the concentration of IgG and IgM – on 4 and 6 days of observation.

Key words: ulcerative colitis, IgG, IgM, interleukin-8, vitamin D3, rectal suppositories

Authors:

Osikov M. V., Doctor of Medical Sciences, professor, Head of the Department of Pathophysiology, South-Ural State Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation, Chelyabinsk, Russia;

Simonyan E. V., Ph.D., Head of the Department of Chemistry and Pharmacy, Pharmaceutical Faculty, South-Ural State Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation, Chelyabinsk, Russia;

Boyko M. S., ✉ Assistant, Department of Pathophysiology, South-Ural State Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation, Chelyabinsk, Russia. **E-mail:** ri-tochka9@list.ru

ДИНАМИКА ПЛОТНОСТИ ПРОСТРАНСТВЕННОГО РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ТУЧНЫХ КЛЕТОК ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ В УСЛОВИЯХ ПРЕРЫВАНИЯ ЛАКТАЦИИ

© 2019 г. А. А. Параскун*, С. Ю. Виноградов

*E-mail: aparaskuna@mail.ru

ФГБОУ ВО «Ивановская государственная медицинская академия»
Минздрава РФ, Иваново, Россия

Поступила: 15.03.2019. Принята: 02.04.2019

Установлено, что в условиях прерывания лактации у крыс на 2 сутки исследований общее количество тучных клеток (ТК) максимально. Далее (3–7 сутки) плотность пространственного распределения ТК снижается с минимумом на 7 день наблюдений. Через 14 суток число ТК увеличивается, с последующим уменьшением на 21 сутки испытаний. Эти изменения происходят синхронно с динамикой параметров морфофункциональной активности железы.

Ключевые слова: щитовидная железа, тучные клетки, прерывание лактации

DOI: 10.31857/S102872210006573-5

Адрес: 153012, Ивановская область, Иваново, Шереметевский проспект, 8, ФГБОУ ВО «Ивановская государственная медицинская академия» Минздрава РФ, кафедра биологии. Параскун Андрей Анатольевич. Тел.: 8 910 690 83 78 (моб.).

E-mail: aparaskuna@mail.ru

Авторы:

Параскун А. А., к.б.н., доцент кафедры биологии ФГБОУ ВО «Ивановская государственная медицинская академия» Минздрава России, Иваново, Россия;

Виноградов С. Ю., д.м.н., профессор кафедры гистологии, эмбриологии, цитологии ФГБОУ ВО «Ивановская государственная медицинская академия» Минздрава России, Иваново, Россия.

Известно, что женщины чаще, чем мужчины, страдают от тиреоидных нарушений. В последние годы распространенность этих заболеваний у женщин увеличивается. Щитовидная железа (ЩЖ) играет важную роль в регуляции процессов жизнедеятельности организма. Она контролируется двумя тесно взаимосвязанными системами: трансагипофизарной и нервно-проводниковой. Наряду с этим в поддержании внутриорганного гомеостаза щитовидной железы принимают участие тучные клетки (тканевые базофилы), которые накапливают и выделяют широкий спектр биологически активных веществ (гистамин, гепарин, серотонин, катехоламины, цитокины, липидные медиаторы

и др.) [1]. Тем самым, регулируя пролиферацию клеток, их дифференцировку, функциональную активность, межклеточные взаимодействия, как в норме, так и в условиях воспаления, регенерации, аутоиммунных реакций [2, 3].

Цель исследований – оценка динамики плотности пространственного распределения тучных клеток (ТК) щитовидной железы в условиях прерывания лактации у крыс.

Работа выполнена на 40 здоровых беспородных крысах-самках зрелого репродуктивного возраста. После 5 дней вскармливания потомства лактацию прерывали путем отсаживания крысят от матери. Сроки эксперимента составили 2, 3, 7, 14, 21 сутки. Исследования с животными проводили в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приказ № 724 Минвуза от 13.11.1984 г.). После забоя у крыс отделяли обе доли щитовидной железы. Одна доля сразу же подвергалась криостатному микрофрированию, а другая – парафиновой проводке. Для оценки плотности пространственного распределения тканевых базофилов криостатные срезы толщиной 20 мкм окрашивали альциановым синим-сафранином в прописи J. Desaga и изучали с помощью микроскопа БИММ Р13

(об. 90, ок. 10). Подсчитывали общее количество тканевых базофилов в поле зрения (10 полей зрения – 1 варианта статистического массива) отдельно в центральных и периферических зонах железы [3]. При анализе результатов тучные клетки были разделены на основе сродства гранул к тому или иному красителю на 3 группы: 1 – альцианофильные, окрашивающиеся только альциановым синим; 2 – миксные, содержащие альцианофильные и сафранинофильные гранулы; 3 – сафранинофильные, окрашивающиеся сафранином. Морфометрические исследования препаратов ЩЖ, окрашенных гематоксилин-эозином, проводили с помощью анализатора изображений, используя программу ВИДЕО ТЕСТ МАСТЕР. Содержание тироксина в сыворотке крови животных определяли методом твердофазного ИФА. Статистическая обработка материала проводилась с использованием интерпрограмм «Microsoft Excel 2010», «Статистика 6,0». Для выявления и анализа внутри- и межрегиональных сопряжений изменения оценочных параметров применялся непараметрический метод рангового корреляционного анализа Спирмена.

Выявлено, что тканевые базофилы чаще всего располагаются около кровеносных сосудов, нередко тесно примыкают к базальной мембране фолликулов и перифолликулярных капилляров. Плотность пространственного распределения волнообразно изменяется на протяжении всего эксперимента. На 2 сутки исследований общее количество ТК максимально. Далее (3–7 сутки) плотность пространственного распределения ТК снижается с минимумом на 7 день наблюдений. Через 14 суток число ТК увеличивается, с последующим уменьшением на 21 сутки испытаний. При анализе дифференциальной окраски было установлено, что на 2 день эксперимента преобладают сафранинофильные и миксные ТК, а позднее (3–21 сутки) сафранинофильные. Плотность альцианофильных ТК минимальна, за исключением 2–3 суток после прерывания лактации. Динамика межрегиональных (центр-периферия) изменений общего количества ТК синхронизирована. Отмечается достоверно большее

количество ТК в периферической зоне щитовидной железы. Ранговый корреляционный анализ демонстрирует хроносопряженность изменений плотности пространственного распределения ТК и морфофункциональных параметров щитовидной железы.

При моделировании прерывания лактации, наблюдаемые изменения количественных показателей цитоархитектоники тучных клеток носят адаптивный характер, т.к. тканевые базофилы создают оптимальное микроокружение, направленное на поддержание функциональной активности щитовидной железы в изменившихся условиях существования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Параскун А. А., Виноградов С. Ю., Штойко М. А., Сорокина Н. В., Пономарева Т. Н. Динамика изменений плотности пространственного распределения тканевых базофилов щитовидной железы в первой половине беременности // Российский иммунологический журнал. 2012, 6(14); 2(1), 139–140. [Paraskun A. A., Vinogradov S. Yu., Shtoyko M. A., Sorokina N. V., Ponomaryova T. N. Dynamics of changes in the density of the spatial distribution of tissue basophils of the thyroid gland in the first half of pregnancy // Russian journal of immunology. 2012, 6(14); № 2(1), 139–140.]
2. Диндяев С. В. Внутри- и внеорганные структуры в системе биоаминового обеспечения матки // Сборник научных трудов SWorld. Материалы международной научно-практической конференции «Современные направления теоретических и прикладных исследований 2012». Выпуск 1. Том 30. Одесса: КУПРИЕНКО, 2012, 74–84. [Dindyayev S. V. Intra- and extraorgan structures in the system of uterus bioamine supply // Collected scientific reports SWorld. Materials of the international scientific and practical conference «Modern trends of theoretical and applied research 2012». Issue 1. Vol. 30. Odessa: KUPRIENKO, 2012, 74–84.]
3. Здор В. В., Маркелова Е. В., Гельцер Б. И. Тиреоидный статус и его взаимосвязь с функциональной активностью иммуноцитов // Медицинская иммунология. 2017, 19; 3, 293–300. [Zdor V. V., Markelova E. V., Geltser B. I. Thyroid status and is correlation with the functional activity of immunocytes // Medical Immunology (Russia)/ Meditsinskaya Immunologiya. 2017, 19; 3, 293–300.]

**DYNAMICS OF DENSITY OF SPATIAL DISTRIBUTION OF MAST CELLS
OF THE THYROID GLAND IN CONDITIONS OF INTERRUPTION
OF LACTATION**

© 2019 **A. A. Paraskun*, S. Yu. Vinogradov**

**E-mail: aparaskuna@mail.ru*

FSBEI HE IvSMA MOH Russia, Ivanovo, Russia

Received: 15.03.2019. **Accepted:** 02.04.2019

It was established that under conditions of interruption of lactation in rats on the 2nd day of research, the total number of fat cells is maximum. Then (3–7 days) the density of spatial distribution of tissue basophils decreases with a minimum of 7 days of observation. After 14 days, the number of mast cells increases, followed by a decrease of test days 21. These changes occur synchronously with the dynamics of the parameters of the morphofunctional activity of the gland.

Key words: thyroid gland, mast cells, interruption of lactation

Authors:

Paraskun A. A., ✉ PhD, associate professor of department of biology FSBEI HE IvSMA MOH Russia, Ivanovo, Russia.

E-mail: aparaskuna@mail.ru;

Vinogradov S. Yu., PhD, professor of department of histology, embryology, cytology FSBEI HE IvSMA MOH Russia, Ivanovo, Russia.

МЕТАБОЛИЧЕСКОЕ РЕПРОГРАММИРОВАНИЕ МАКРОФАГОВ, АКТИВИРОВАННЫХ АГОНИСТОМ РЕЦЕПТОРА NOD1

© 2019 г. М. В. Пашенков^{1*}, Н. Е. Муругина¹, Л. С. Балясова¹,
А. С. Будихина¹, П. В. Максимчик², Ю. А. Дагиль¹, В. В. Муругин¹,
Г. З. Чкадуа³, Б. В. Пинегин¹

*E-mail: mvpashenkov@yandex.ru

¹ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, Москва, Россия;

²Московский Государственный Университет им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия;

³ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России, Москва, Россия

Поступила: 28.02.2019. Принята: 14.03.2019

Впервые охарактеризована перестройка углеводного и энергетического метаболизма макрофагов человека, активированных агонистом рецептора NOD1 – N-ацетил-D-мурамил-L-аланил-D-изоглутамил-мезо-диаминопимелиновой кислотой (M-триДАП) в сопоставлении с эффектами агониста TLR4 – липополисахарида (ЛПС). Показаны возможности модуляции выработки цитокинов макрофагами с помощью ингибиторов гликолиза.

Ключевые слова: макрофаги, метаболическое репрограммирование, гликолиз, мурамилпептиды, NOD1, TLR4

DOI: 10.31857/S102872210006572-4

Адрес: 115522 Москва, Каширское шоссе, д. 24, ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, лаборатория клинической иммунологии, Пашенков Михаил Владимирович. Тел: +7(499)6177649, +7(909)9301770

E-mail: mvpashenkov@yandex.ru

Авторы:

Пашенков М. В. д.м.н., и.о. заведующего лабораторией клинической иммунологии ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, Москва, Россия;

Муругина Н. Е., младший научный сотрудник лаборатории клинической иммунологии ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, Москва, Россия;

Балясова Л. С., младший научный сотрудник лаборатории клинической иммунологии ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, Москва, Россия;

Будихина А. С., к.м.н., научный сотрудник лаборатории клинической иммунологии ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, Москва, Россия;

Максимчик П. В., к.м.н., научный сотрудник лаборатории изучения механизмов апоптоза, Факультет фундаментальной медицины, Московский Государственный Университет им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия;

Дагиль Ю. А., научный сотрудник целевой поисковой лаборатории иммунологии Фонда перспективных исследований ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, Москва, Россия;

Муругин В. В., к.м.н., научный сотрудник лаборатории клинической иммунологии ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, Москва, Россия;

Чкадуа Г. З., к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей, ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России, Москва, Россия;

Пинегин Б. В., д.м.н., профессор, заведующий отделом иммунодиагностики и иммунокоррекции ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, Москва, Россия.

При активации клеток иммунной системы происходит перестройка их метаболизма (метаболическое репрограммирование), обеспечивающая выполнение клетками их эффекторных функций [1, 2]. Однако данный процесс изучен, в основном, в условиях активации клеток ЛПС. Мурамилпептиды – фрагменты пептидогликана бактерий – активируют клетки врожденной иммунной системы через рецепторы NOD1 и/или NOD2. В работе впервые охарактеризована перестройка углеводного и энергетического метаболизма макрофагов человека, активированных агонистом NOD1 (M-триДАП) в сопоставлении с эффектами ЛПС, а также взаимосвязь метаболической перестройки и продукции провоспалительных цитокинов.

Анализ метаболизма в реальном времени (технология Seahorse) показал, что и M-триДАП,

и ЛПС в течение 1 ч после добавления к культурам макрофагов вызывали усиление гликолиза, выражающееся в повышении скорости закисления внеклеточной среды, потребления глюкозы и высвобождения лактата. Одновременно происходило незначительное снижение потребления кислорода. Схожая активация гликолиза наблюдалась в перитонеальных макрофагах мышей, получивших агонист рецептора NOD2 (ГМДП) в дозе 100 мкг подкожно. Влияние М-триДАП и ЛПС на гликолиз блокировалось 2-дезоксид-Д-глюкозой (2-ДГ, конкурентный ингибитор гликолиза) и ингибитором киназы Akt (Akt-I-1/2), но не зависело от активности киназного комплекса mTORC1, от активности положительного регулятора гликолиза PFKFB3 и от повышения экспрессии ферментов гликолиза.

Влияние 2-ДГ и ингибитора Akt на экспрессию цитокинов, индуцированную М-триДАП и ЛПС, было неоднозначным. Ингибитор Akt снижал экспрессию мРНК TNF, IL-6 и IL-1 β , а также продукцию TNF на ранних этапах активации М-триДАП (1 ч), но не влиял на экспрессию тех же цитокинов, индуцированную ЛПС.

2-ДГ подавляла экспрессию TNF и IL-6 через ранней стадии (1 ч), но усиливала ее на поздней стадии (4–9 ч) после добавления М-триДАП и ЛПС. Позднее усиливающее влияние 2-ДГ на экспрессию цитокинов опосредовалось через индукцию стресса эндоплазматического ретикула, поскольку устранялось добавлением маннозы. Особенности влияния модуляторов гликолиза на продукцию цитокинов необходимо учитывать при возможном применении этих препаратов как средств лечения воспалительных заболеваний человека.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. O'Neill L. A., Pearce E. J. Immunometabolism governs dendritic cell and macrophage function. *J Exp Med* 2015, 213, 15–23.
2. Jha A. K., Huang S. C., Sergushichev A., Lampropoulou V., Ivanova Y., Loginicheva E., Chmielewski K., Stewart K. M., Ashall J., Everts B., Pearce E. J., Driggers E. M., Artyomov M. N. Network integration of parallel metabolic and transcriptional data reveals metabolic modules that regulate macrophage polarization. *Immunity* 2015, 42 (3), 419–430.

METABOLIC REPROGRAMMING OF MACROPHAGES ACTIVATED BY A NOD1 RECEPTOR AGONIST

© 2019 M. V. Pashenkov^{1*}, N. E. Murugina¹, A. S. Budikhina¹, P. V. Maximchik², Y. A. Dagil¹, L. S. Balyasova¹, V. V. Murugin¹, G. Z. Chkadua³, B. V. Pinegin¹

*E-mail: mypashenkov@yandex.ru

¹National Research Center "Institute of Immunology" of the Federal Medical-Biological Agency of Russia, Moscow, Russia;

²Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia;

³FSBI "N. N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology" of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

Received: 28.02.2019. Accepted: 14.03.2019

We provide the first characterization of glucose and energy metabolism rearrangements in human macrophages upon their activation with a NOD1 receptor agonist (N-acetyl-D-muramyl-L-alanyl-D-isoglutamyl-meso-diaminopimelic acid, or M-triDAP) in comparison with the effects of a TLR4 agonist, lipopolysaccharide (LPS). We demonstrate possibilities of modulation of cytokine production by macrophages using glycolysis inhibitors.

Key words: macrophages, metabolic reprogramming, glycolysis, muramyl peptides, NOD1, TLR4

Authors:

Pashenkov M. V., ✉ Doctor of medical sciences, Acting head of the Laboratory of Clinical Immunology, National Research Center “Institute of Immunology” of the Federal Medical-Biological Agency of Russia, Moscow, Russia. **E-mail:** mvpashenkov@yandex.ru;

Murugina N. E., junior researcher, Laboratory of Clinical Immunology, National Research Center “Institute of Immunology” of the Federal Medical-Biological Agency of Russia, Moscow, Russia;

Budikhina A. S., PhD, researcher, Laboratory of Clinical Immunology, National Research Center “Institute of Immunology” of the Federal Medical-Biological Agency of Russia, Moscow, Russia;

Maximchik P. V., PhD, researcher, Faculty of Fundamental Medicine, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia;

Dagil Y. A., researcher, Laboratory of Clinical Immunology, National Research Center “Institute of Immunology” of the Federal Medical-Biological Agency of Russia, Moscow, Russia;

Balyasova L. S., junior researcher, Laboratory of Clinical Immunology, National Research Center “Institute of Immunology” of the Federal Medical-Biological Agency of Russia, Moscow, Russia;

Murugin V. V., PhD, researcher, Laboratory of Clinical Immunology, National Research Center “Institute of Immunology” of the Federal Medical-Biological Agency of Russia, Moscow, Russia;

Chkadua G. Z., PhD, senior researcher, Laboratory of experimental diagnostics and biotherapy of tumors, FSBI “N. N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology” of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia;

Pinegin B. V., Professor, Doctor of medical sciences, Head of the Department of immunodiagnosics and immunocorrection, National Research Center “Institute of Immunology” of the Federal Medical-Biological Agency of Russia, Moscow, Russia.

МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ И ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ РАЗНОРОДНОСТЬ МАКРОФАГОВ РАЗЛИЧНОЙ ЛОКАЛИЗАЦИИ У ЖИВОТНЫХ В НОРМЕ И В УСЛОВИЯХ САХАРНОГО ДИАБЕТА I-ГО ТИПА

© 2019 г. В. А. Поздина^{1,2*}, И. Г. Данилова¹

*E-mail: varya.pozdina@inbox.ru

¹Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения
Российской академии наук, Екатеринбург, Россия;

²ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр фтизиопульмонологии
и инфекционных заболеваний» Минздрава России, Екатеринбург, Россия

Поступила: 14.03.2019. Принята: 26.03.2019

В работе были исследованы морфологические и функциональные характеристики макрофагов различной локализации, выделенных из интактных животных и животных с моделью сахарного диабета I-го типа. Исследование проводилось на культурах макрофагов крысы, выделенных из следующих областей: легкие, селезенка, печень и перитонеальная полость. Определялись следующие морфометрические показатели: S клетки, цитоплазмы и ядер, ядерно-цитоплазматическое отношение (ЯЦО). Фенотип макрофагов определялся по экспрессии CD163 и CD80. Цитокиновая активность макрофагов оценивалась по уровню IL-1 α , IL-10 и TNF- α . В результате проведенных исследований были показаны особенности морфологии макрофагов различных органов, а также выявлены их функциональные отличия.

Ключевые слова: макрофаги, морфофункциональные особенности, локализация

DOI: 10.31857/S102872210006571-3

Адрес: 620049, Российская Федерация, г. Екатеринбург ул. Первомайская, 106, Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, Поздина Варвара Александровна.
Тел.: +7 908 638 79 32.

E-mail: varya.pozdina@inbox.ru

Авторы:

Поздина В. А., м.н.с. лаборатории морфологии и биохимии ИИФ УрО РАН, м.н.с. лаборатории биомедицинских исследований ФГБУ «НМИЦ ФПИ» Минздрава России, Екатеринбург, Россия;

Данилова И. Г., д.б.н., заведующая лабораторией морфологии и биохимии ИИФ УрО РАН, Екатеринбург, Россия.

Макрофаги — это разнородная группа клеток врожденного иммунитета, отличающихся между собой по морфологическими и функциональным признакам, участвующая напрямую или опосредованно в широком спектре как защитных реакций организма (реакции адаптивного иммунитета), так и регуляторных (участие в регенерации тканей и в регулировании обмена жиров и углеводов). Благодаря высокой гетерогенности, данный тип клеток играет важную

роль в патогенезе различных заболеваний [1]. В частности, в поджелудочной железе макрофаги работают в двух направлениях: они могут инициировать иммунные реакции и реакции регенерации, стимулируя иммунные клетки, а могут оказывать разрушительное действие на клетки, продуцирующие инсулин [2]. При поиске методов лечения сахарного диабета I-го типа интерес представляет возможность воздействия на макрофаги, как на звено местной регуляторной цепи. В связи с этим была поставлена задача, подробно изучить особенности функционирования различных популяций макрофагов в норме и в условиях сахарного диабета I-го типа (СД I-го типа), для того чтобы в дальнейшем исследовать реакции этих клеток на различные стимулы, в том числе и на иммуномодулирующие препараты.

В работе использовались популяции макрофагов различной тканевой принадлежности (альвеолярные, перитонеальные, печеночные и селезеночные макрофаги), полученные из

интактных и «сахарно-диабетных» (срок моделирования сахарного диабета 30 суток) самцов крыс 3-месячного возраста породы Wistar. Макрофаги различной органной принадлежности культивировали в течение 24 часов.

В качестве морфометрических показателей определялись площадь клетки, цитоплазмы и ядер, а также ядерно-цитоплазматическое отношение (ЯЦО) [3]. С помощью иммуноцитохимического метода оценивалась функциональная фенотипическая активность макрофагов по уровню их экспрессии рецепторов CD163 и CD80. Цитокиновая активность макрофагов оценивалась с помощью иммуноферментного анализа по уровню IL-1 α , IL-10 и TNF α в среде, в которой культивировались выделенные клетки [4].

Измерения морфофункциональных показателей производилось с помощью камеры AxioCam 512, подключенной к микроскопу Carl Zeiss Axio Observer D1 (УНИИФ), и программы ZEN. Статистический анализ полученных данных проводился с помощью программы STATISTICA.10. Различия считались достоверными при $p < 0,05$.

Морфометрический анализ в интактных животных показал значимое различие между популяциями перитонеальных макрофагов и макрофагов печени с популяциями альвеолярных макрофагов и макрофагов селезенки. У первых двух групп S цитоплазмы и клеток значимо больше, чем у альвеолярных и селезеночных макрофагов. Визуально популяции хорошо различимы: среди перитонеальных макрофагов встречается большое количество характерных почти идеально круглых клеток с одним небольшим круглым ядром; остальные клетки в большинстве своем округлые и меньшей величины. Среди селезеночных же подавляющее большинство клеток небольшие, неправильной формы, и большую часть клетки у них так же занимает ядро. По количеству ядер клетки всех популяций достаточно близки: большинство клеток имеет одно ядро, меньшее количество — два ядра.

В группе животных с СД I-го типа морфометрические параметры менее различимы между представленными популяциями клеток. Клетки более однородны по размерам. Среди всех групп макрофагов чаще встречаются клетки с ядрами неправильной формы, в которых деление произошло, но ядра не до конца разделились.

Сравнительный анализ между интактными животными и животными с СД I-го типа показывает, что морфометрические параметры пе-

ритонеальных макрофагов и макрофагов печени из этих двух групп имеют значимые различия. У клеток с СД I-го типа наблюдается тенденция к уменьшению размеров клеток за счет уменьшения S цитоплазмы. Предположительно, это связано с тем, что макрофагальные клетки при сахарном диабете активно участвуют в регуляторных процессах.

Анализ ЯЦО показывает, что у интактных животных наибольшим значением ЯЦО обладают макрофаги селезенки, наименьшим — макрофаги печени. У животных с СД I-го типа макрофаги печени, наоборот, имеют наибольший ЯЦО. Сравнительный анализ между интактными животными и животными с диабетом показывает, что значимые отличия в ЯЦО наблюдаются у перитонеальных макрофагов и макрофагов печени. Это может быть связано с тем, что перитонеальные макрофаги и макрофаги печени наиболее активно участвуют в местных регуляторных реакциях в условиях СД I-го типа.

В рамках фенотипического анализа была измерена S окрашенного экспрессируемого ($S_{\text{эксп}}$) участка клетки. $S_{\text{эксп}}$ CD80 в макрофагах, выделенных из интактных животных практически не отличаются между собой. $S_{\text{эксп}}$ CD163 в популяциях макрофагов интактных животных больше, чем $S_{\text{эксп}}$ CD80, однако эти различия не достоверны. $S_{\text{эксп}}$ CD80 клеток, выделенных из животных с СД I-го типа значимо увеличен в сравнении с клетками, выделенными из интактных животных, в особенности у перитонеальных макрофагов и макрофагов селезенки. $S_{\text{эксп}}$ CD163 значимо меньше у макрофагов печени.

В сравнении с макрофагами, выделенными из интактных животных у макрофагов, выделенных из животных с СД I-го типа, значительно выше уровни TNF α , в особенности у органных макрофагов (селезенка, печень). Уровень IL-1 α в целом незначительно выше у группы клеток, выделенных из животных с СД I, в особенности у макрофагов печени. Уровень IL-10 значимо отличается у макрофагов печени «сахарно-диабетных» животных от макрофагов печени, выделенных из интактных животных.

Все перечисленные данные показывают, что макрофаги в условиях сахарного диабета I типа, находятся преимущественно в состоянии классической воспалительной активации, что может также указывать на их непосредственную активную деятельность в области органа-мишени сахарного диабета — поджелудочной железе.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. *Liddiard K.* Macrophage heterogeneity and acute inflammation. *Europ. J. of Immunol.* 2011, 41(9), 2503–2508.
2. *Md. Shahidul Islam.* The Islets of Langerhans. 2010, 800.Р.9.
3. *Шарафутдинова Л. А., Горшкова Е. Н., Садртинова И. И., Хисмадулина З. Р., Башкатов С. А.* Оценка морфологических параметров нейтрофильных гранулоцитов методом атомно-силовой микроскопии после воздействия фуллерена C60. *Биомедицина.* 2014, 3, 49–53. [*Sharafutdinova L. A., Gorshkova E. N., Sadrtinova I. I., Khismatullina Z. R.* Neutrophils morphological parameters estimation by nuclear and power microscopy after fullerene C60 influence // *Biomedicina.* 2014, 3, 49–53.]
4. *Mohammadi A., Blesso C.N., Barreto G.E., Banach M., Majeed M., Sahebkar A.* Macrophage plasticity, polarization and function in response to curcumin, a diet-derived polyphenol, as an immunomodulatory agent. *J NutrBiochem.* 2018.1–16.

**MORPHOLOGICAL AND FUNCTIONAL DIVERSITY OF MACROPHAGES
OF DIFFERENT LOCALIZATION IN ANIMALS IN NORMAL
AND IN CONDITIONS OF DIABETES MELLITUS TYPE I**

© 2019 V. A. Pozdina^{1,2*}, I. G. Danilova¹

*E-mail: varya.pozdina@inbox.ru

¹*Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences,
Ekaterinburg, Russia;*

²*Ural Scientific Research Institute of Phthisiopulmonology – branch of FGBU “NMIC FPI”,
Ministry of Health of the Russian Federation, Ekaterinburg, Russia*

Received: 14.03.2019. **Accepted:** 26.03.2019

The study investigated the morphological and functional characteristics of macrophages of different localization, isolated from intact animals and animals with a model of diabetes mellitus type I. The study was performed on rat macrophage cultures isolated from the following areas: lungs, spleen, liver, and peritoneal cavity. The following morphometric parameters were determined: S cells, cytoplasm and nuclei, nuclear-cytoplasmic ratio (NCO). The phenotype was determined by the expression of CD163 and CD80. The macrophage cytokine activity was assessed by the level of IL-1 α , IL-10 and TNF α . The morphological characteristics of macrophages from various organs were demonstrated and their functional differences were revealed.

Key words: macrophages, macrophage phenotype, macrophage characteristics

Authors:

Pozdina V. A., ✉ JR, Laboratory of Morphology and Biochemistry, Institute of Immunology and Physiology of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, JR, Laboratory of Biomedical Research, Ural research Institute of Phthisiopulmonology, Ekaterinburg, Russia. **E-mail:** varya.pozdina@inbox.ru;

Danilova I. G., Doctor of Biological Sciences, Head of the Laboratory of Morphology and Biochemistry, Institute of Immunology and Physiology of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russia.

СОДЕРЖАНИЕ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК-ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ В ПУПОВИННОЙ КРОВИ ПРИ ПРЕЭКЛАМПСИИ

© 2019 г. И. Г. Попова*, С. Б. Назаров, Г. Н. Кузьменко, Н. В. Крошкина, О. Г. Ситникова, М. М. Клычева

*E-mail: i_g_popova@mail.ru

ФГБУ «Ивановский научно-исследовательский институт материнства и детства им. В. Н. Городкова» Минздрава России, Иваново, Россия

Поступила: 13.03.2019. Принята: 25.03.2019

Проводилось определение содержания эндотелиальных клеток-предшественников в пуповинной крови у новорожденных, родившихся у матерей с преэклампсией и без преэклампсии. Фенотипирование эндотелиальных клеток пуповинной крови осуществлялось методом проточной цитофлуориметрии, циркулирующие эндотелиальные клетки (ЦЭК) определяли как: CD45⁻, CD133⁺, VEGFR2⁺, CD34⁻, эндотелиальные клетки-предшественники (ЭПК) определялись как: CD45⁻, CD133⁺, VEGFR2⁺, CD34⁺. Выявлено снижение как общего количества циркулирующих эндотелиальных клеток, так и эндотелиальных клеток-предшественников у недоношенных новорожденных по сравнению с доношенными детьми. В группах недоношенных и доношенных новорожденных, родившихся от матерей с преэклампсией, было достоверно выше только количество ЭКП, по сравнению с новорожденными от матерей без преэклампсии.

Ключевые слова: пуповинная кровь, преэклампсия, новорожденные, эндотелиальные клетки-предшественники

DOI: 10.31857/S102872210006550-0

Адрес: 153045 Иваново, ул. Победы, д. 20, ФГБУ «Ивановский НИИ Мид им. В. Н. Городкова» Минздрава России, лаборатория клинической биохимии и генетики, Попова Ирина Геннадьевна. Тел.: 8 910 986 50 82 (моб.).

E-mail: i_g_popova@mail.ru

Авторы:

Попова И. Г., к. м. н., научный сотрудник лаборатории клинической биохимии, врач клинической лабораторной диагностики ФГБУ «Ивановский научно-исследовательский институт материнства и детства им. В. Н. Городкова» Минздрава России, Иваново, Россия;

Назаров С. Б., д. м. н., профессор, зам. директора института по научной работе, зав. лабораторией клинической биохимии и генетики ФГБУ «Ивановский научно-исследовательский институт материнства и детства им. В. Н. Городкова» Минздрава России, Иваново, Россия;

Кузьменко Г. Н., д. м. н., в. н. с. лаборатории клинической биохимии, зав. клинико-диагностической лабораторией ФГБУ «Ивановский научно-исследовательский институт материнства и детства им. В. Н. Городкова» Минздрава России, Иваново, Россия;

Крошкина Н. В., к. б. н., научный сотрудник лаборатории клинической иммунологии ФГБУ «Ивановский научно-исследовательский институт материнства и детства им. В. Н. Городкова» Минздрава России, Иваново, Россия;

Ситникова О. Г., к. б. н., старший научный сотрудник лаборатории клинической биохимии и генетики ФГБУ «Ивановский научно-исследовательский институт материнства

и детства им. В. Н. Городкова» Минздрава России, Иваново, Россия;

Клычева М. М., младший научный сотрудник лаборатории клинической биохимии и генетики ФГБУ «Ивановский научно-исследовательский институт материнства и детства им. В. Н. Городкова» Минздрава России, Иваново, Россия.

АКТУАЛЬНОСТЬ

В структуре акушерской патологии ведущее место занимает преэклампсия (ПЭ) матери, которая является основной причиной перинатальной заболеваемости и смертности. Эндотелиальная дисфункция является важным патогенетическим механизмом преэклампсии и способствует нарушению роста и развития плода, рождению недоношенных детей, формированию перинатальных поражений гипоксического характера центральной нервной, сердечно-сосудистой, эндокринной, иммунной, дыхательной и других систем, геморрагическим нарушениям. Это негативно влияет на состояние здоровья детей в последующие годы жизни. [1]. В последние годы большое внимание уделяется изучению циркулирующих

эндотелиальных клеток (ЦЭК) и эндотелиальных клеток-предшественников (ЭКП) [2]. Считают, что эти клетки отражают состояние эндотелия и его регенеративные возможности.

Количество ЭКП в пуповинной крови зависит от особенностей течения беременности и родов, наличия острой или хронической гипоксии плода, срока гестации, пола и веса новорожденного [3, 4].

Цель исследований. Определение содержания циркулирующих эндотелиальных клеток в пуповинной крови для оценки регенераторного потенциала эндотелия пуповины у новорожденных, родившихся у матерей с преэклампсией.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе была использована плазма пуповинной крови 60 новорожденных младенцев, из них 30 недоношенных новорожденных, среди которых 15 новорожденных от матерей с преэклампсией и 30 доношенных новорожденных, из которых 15 детей родились от матерей с преэклампсией. Фенотипирование эндотелиальных клеток пуповинной крови осуществлялось методом многоцветной проточной цитофлуориметрии с помощью моноклональных антител, на приборе FACSCantoII. Циркулирующие эндотелиальные клетки определялись как CD45⁻CD133⁺VEGFR2⁺CD34⁻, эндотелиальные клетки-предшественники (ЭКП) определялись как: CD45⁻CD133⁺VEGFR2⁺CD34⁺. Статистический анализ результатов исследования выполнен с помощью компьютерной программы статистической обработки данных Statistica 6.0 («StatSoft») for Windows.

РЕЗУЛЬТАТЫ

При сравнении полученных результатов среди доношенных и недоношенных новорожденных от матерей без преэклампсии выявлено, что у недоношенных новорожденных общее количество циркулирующих эндотелиальных клеток меньше, чем у доношенных новорожденных ($p=0,009$). Отмечается снижение как количества зрелых эндотелиоцитов с фенотипом CD45⁻CD133⁺VEGFR2⁺CD34⁻, так и эндотелиальных клеток-предшественников с фенотипом CD45⁻CD133⁺VEGFR2⁺CD34⁺, $p=0,009$; $p=0,013$, соответственно. При сопоставлении данных соотношения этих клеток внутри групп, отмечено, что у недоношенных новорожденных процент эндотелиальных клеток-предшественников

с фенотипом CD45⁻CD133⁺VEGFR2⁺CD34⁺ выше в 1,9 раза, чем эндотелиоцитов с фенотипом CD45⁻CD133⁺VEGFR2⁺CD34⁻ ($p<0,013$ и $p<0,014$). У доношенных новорожденных содержание зрелых эндотелиоцитов с фенотипом CD45⁻CD133⁺VEGFR2⁺CD34⁻ в крови выше в 1,2 раза по сравнению с клетками предшественниками. При сравнении полученных результатов среди доношенных и недоношенных новорожденных от матерей с преэклампсией отмечается снижение только количества эндотелиальных клеток-предшественников с фенотипом CD45⁻CD133⁺VEGFR2⁺CD34⁺, $p=0,008$. При сравнении полученных результатов в группах новорожденных в зависимости от наличия или отсутствия преэклампсии у матери выявлено, что у новорожденных, родившихся от матерей с преэклампсией, количество клеток предшественников с фенотипом CD45⁻CD133⁺VEGFR2⁺CD34⁺ достоверно выше, чем у новорожденных от матерей без преэклампсии, и в группе недоношенных и доношенных новорожденных, $p<0,02$ и $p<0,03$, соответственно.

ОБСУЖДЕНИЕ

Таким образом, снижение количества эндотелиальных клеток-предшественников у недоношенных новорожденных по сравнению с доношенными новорожденными ассоциировано с нарушением эндотелиальной функции и снижением регенераторного потенциала эндотелия. Повышение количества эндотелиальных клеток-предшественников у новорожденных от матерей с преэклампсией, вероятно, свидетельствует о компенсаторных возможностях организма.

Исследование поддержано грантом РФФИ № 18-415-370002/18.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Перфилова В. Н., Михайлова Л. И., Тюренков И. Н. Последствия гестоза (преэклампсии). Российский вестник перинатологии и педиатрии. 2014;2:13–17. [Perfilova V. N., Mikhailova L. I., Tiurenkov I. N. Consequences of gestosis (preeclampsia). Rossiiskii vestnik perinatologii i pediatrii. 2014;2:13–17. (in Russ)].
2. Paviotti G., Boscaroet E., Fadini G. P., Agostini C. Endothelial progenitor cells, bronchopulmonary dysplasia and other short-term outcomes of extremely preterm birth. Stem Cells. 2011; 87 (7): 461–5.
3. Румянцев А. Г., Румянцев С. А. Пуповинная кровь как источник информации о состоянии плода. Педиатрия. 2012; 91(3): 43–52. [Rumyantsev A. G., Rumyantsev S. A. Umbilical cord blood as a source of information about the status of the fetus. Pediatriya. 2012; 91(3): 43–52. (in Russ)].

4. Попова И. Г., Назаров С. Б., Кузьменко Г. Н., Крошклина Н. В., Сотникова Н. Ю., Харламова Н. В. Содержание эндотелиальных клеток-предшественников в пуповинной крови у доношенных и недоношенных новорожденных. Российский вестник перинатологии и педиатрии. 2018; 4(63): 58–62. [Popova I. G., Nazarov S. B., Kuzmenko G. N., Kroshkina N. V., Sotnikova N. I. U., Kharlamova N. V. The content of endothelial progenitor cells in umbilical cord blood in full-term and premature infants. Rossiiskii vestnik perinatologii i pediatrii. 2018; 4(63): 58–62. (in Russ)].

CONTENT OF ENDOTHELIAL PROGENITOR CELLS IN UMBILICAL CORD BLOOD IN PREECLAMPSIA

© 2019 I. G. Popova*, S. B. Nazarov, G. N. Kuzmenko, N. V. Kroshkina,
O. G. Sitnikova, M. M. Klycheva

*E-mail: i_g_popova@mail.ru

Ivanovo research Institute of Maternity and Childhood V. N. Gorodkova, Ivanovo, Russia

Received: 13.03.2019. Accepted: 25.03.2019

The content of endothelial progenitor cells in umbilical cord blood was determined in newborns born to mothers with preeclampsia and without preeclampsia. Phenotyping of umbilical cord blood endothelial cells was performed by flow cytometry, circulating endothelial cells (CES) were defined as: CD45⁻, CD133⁺, VEGFR2⁺, CD34⁻, endothelial progenitor cells (EPCS) were defined as: CD45⁻, CD133⁺, VEGFR2⁺, CD34⁺. There was a decrease in both the total number of circulating endothelial cells and endothelial progenitor cells in premature infants compared to full-term ones. In newborns born to mothers with preeclampsia, only the number of ECP was significantly higher, compared with newborns from mothers without preeclampsia, and in the group of premature and full-term newborns.

Key words: cord blood, newborn, preeclampsia, endothelial cell precursors

Authors:

Popova I. G., ✉ candidate of medical Sciences, researcher of clinical biochemistry laboratory, doctor of clinical laboratory diagnostics Ivanovo research Institute of Maternity and Childhood V. N. Gorodkova, Ivanovo, Russia. **E-mail:** i_g_popova@mail.ru;

Nazarov S. B., doctor of medical Sciences, professor, Deputy Director of the Institute for scientific work, head. laboratory of clinical biochemistry and genetics Ivanovo research Institute of Maternity and Childhood V. N. Gorodkova, Ivanovo, Russia;

Kuzmenko G. N., doctor of medical Sciences, leading researcher of laboratory of clinical biochemistry, head. clinical diagnostic laboratory Ivanovo research Institute of Maternity and Childhood V. N. Gorodkova, Ivanovo, Russia;

Kroshkina N. V., candidate of biology, researcher at the laboratory of clinical immunology Ivanovo research Institute of Maternity and Childhood V. N. Gorodkova, Ivanovo, Russia;

Sitnikova O. G., candidate of biology, senior researcher of clinical biochemistry and genetics Ivanovo research Institute of Maternity and Childhood V. N. Gorodkova, Ivanovo, Russia;

Klycheva M. M., researcher of clinical biochemistry laboratory Ivanovo research Institute of Maternity and Childhood V. N. Gorodkova, Ivanovo, Russia.

УРОВНИ ЦИТОКИНОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ У БОЛЬНЫХ ЭССЕНЦИАЛЬНОЙ АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИЕЙ (ЭАГ) II СТАДИИ И РИСК ФОРМИРОВАНИЯ МЕТАБОЛИЧЕСКОГО СИНДРОМА (МС)

© 2019 г. О. А. Радаева^{1*}, А. С. Симбирцев²

*E-mail: radaevamed@mail.ru

¹ФГБОУ ВО «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н. П. Огарева», Саранск, Россия;

²ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург

Поступила: 11.03.2019. Принята: 21.03.2019

Цель – изучить содержание IL-1 β , IL-1 α , IL-1ra, IL-18, IL-18BP, IL-37, IL-6, sIL-6r, LIF, sLIFr, IGF-1, IGFBP-1, TNF- α , sTNF-RI, sVCAM-1, IL-17, IL-2, IL-4, IL-10, TGF- β 1, IL-8, CX3CL1, CXCL10, INF γ , M-CSF, IL-34, VEGF-A, EPO в сыворотке крови у больных ЭАГ II стадии без признаков метаболического синдрома (МС) и сопоставить с частотой формирования МС в последующие 5 лет наблюдения. У 200 пациентов с ЭАГ II стадии с помощью ИФА в сыворотке крови определяли содержание 28 цитокинов. В течение последующих 5 лет фиксировались случаи развития МС. По результатам многофакторного анализа с включением в регрессионную модель Кокса показателей: IL-1 β >20,3 пг/мл, LIF>9,13 пг/мл, M-CSF>453 пг/мл, IGF-1<116000 пг/мл, независимый характер «влияния» на повышение частоты формирования МС при ЭАГ II стадии в последующий пятилетний период оказывают: содержание M-CSF более 453 пг/мл (p<0,001) и IGF-1<116000 пг/мл (p<0,01).

Ключевые слова: эссенциальная гипертензия, метаболический синдром, цитокины

DOI: 10.31857/S102872210006549-8

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, 8 905 378 41 98 (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.

Анализ уровня общемировой смертности ассоциированной с компонентами метаболического синдрома (абдоминальное ожирение, гиперинсулинемия, нарушение толерантности к глюкозе, гипертриглицеридемия, низкий уровень липопротеидов высокой плотности (ЛПВП), высокий уровень липопротеидов низкой плотности

(ЛПНП) и артериальная гипертензия) зарегистрировал удвоение в период с 1980 по 2010 г. [1]. По данным литературы, наиболее значимым для диагностики МС маркерами служат провоспалительные цитокины IL-6 и TNF- α , лептин, медиаторы прооксидантного статуса, уровни IL-10, адипонектина и антиоксидантных факторов [2]. Особый интерес представляет цитокин-опосредованные звенья, определяющие вторичное формирование МС на фоне первичного повышения артериального давления.

Цель исследования – изучить содержание IL-1 β , IL-1 α , IL-1ra, IL-18, IL-18BP, IL-37, IL-6, sIL-6r, LIF, sLIFr, IGF-1, IGFBP-1, TNF- α , sTNF-RI, sVCAM-1, IL-17, IL-2, IL-4, IL-10, TGF- β 1, IL-8, CX3CL1, CXCL10, INF γ , M-CSF, IL-34, VEGF-A, EPO в сыворотке периферической крови у больных ЭАГ II стадии без признаков МС и сопоставить с частотой формирования МС в последующие 5 лет наблюдения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

У 200 пациентов с ЭАГ II стадии в сыворотке крови на момент начала исследования иммуноферментным методом определяли содержание цитокинов, а также уровни глюкозы, ТГ, ЛПНП, ЛПВП. Критерии включения пациента в исследование: ЭАГ II стадии, длительность заболевания 10–14 лет, сопоставимая гипотензивная терапия, уровень общего холестерина < 5,0 ммоль/л, ЛПНП < 3,0 ммоль/л, ЛПВП > 1,0 ммоль/л, ТГ < 1,7 ммоль/л, ТИМ < 0,9 мм, глюкоза < 5,5 мг/дл, ИМТ < 30 кг/м². Критерии исключения: ассоциированные клинические состояния, сахарный диабет 1/2 типов, МС, симптоматическая гипертензия. В течение последующих 5 лет ежегодно регистрировали развитие МС на основе данных о ИМТ, ТИМ, уровнях глюкозы, ТГ, ЛПНП, ЛПВП.

Для статистической обработки данных использовали пакет прикладных программ Statistica 8.0. Рассчитывали абсолютный и относительный риски развития МС. Проводили построение регрессионной модели Кокса с однофакторным и многофакторным анализом.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Ретроспективный анализ особенностей «малой группы» больных ЭАГ II стадии (19 человек) с развитием за 5 лет наблюдения метаболических изменений в виде увеличения содержанием глюкозы, ЛПНП, ТГ крови выше референсных значений, а также ростом ИМТ более 30 (I степень ожирения) зарегистрировал предикторное повышение в сыворотке периферической крови содержания IL-1 β (p<0,05), IL-1 α (p<0,05), LIF (p<0,001), IGF-1 (p<0,001), M-CSF (p<0,001) при сравнении с группой без осложнений (181 человек) за анализируемый период. Данные за потенциально предикторную 5-летнюю информативность средних уровней IL-18, IL-18BP, sIL-6r, sTNF-RI, sVCAM, IL-2, IL-8, IL-4, IFN γ , IL-37, IL-17A, sLIFr, TNF- α , IGFBP-1, IL-34, VEGF-A, CX3CL1, CXCL10, TGF β 1, EPO) не выявлено (p>0,05). Дальнейший интерквартильный анализ распределения числа больных с ЭАГ и МС на 6–10 годах наблюдения с учетом уровней в сыворотке крови IL-1 β , LIF, IGF-1, M-CSF выявил, что при содержании: IL-1 β более 20,3 пг/мл – риск увеличился в 1,69 раза (p<0,05) и был равен 16%, критерий $\chi^2=2,41$ (p<0,05), C=0,18 (связь слабая), LIF более 9,13 пг/мл рост риска в 2,91 раза (p<0,001),

31%, критерий $\chi^2=5,12$ (p<0,001), C=0,17 (связь относительно сильная), M-CSF более 453 пг/мл повышение в 3,25 раза (p<0,001), что составило 62%, критерий $\chi^2=32,5$ (p<0,001), C=0,6 (связь относительно сильная). Проведенный однофакторный анализ (регрессионная модели Кокса) значимости зарегистрированных уровней изменений содержания цитокинов в сыворотке крови больных ЭАГ II стадии: IL-1 β > 20,3 пг/мл, LIF > 9,13 пг/мл, M-CSF > 453 пг/мл, IGF-1 < 116000 пг/мл в отношении развития МС в последующие 5 лет подтвердил достоверность определенных факторов. По результатам многофакторного анализа независимый характер «влияния» на повышение частоты развития МС при ЭАГ II стадии в последующий 5-летний период (предикторный характер) оказывают: содержание M-CSF более 453 пг/мл (p<0,001) и IGF-1 < 116000 пг/мл (p<0,01).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Зарегистрированный дисбаланс в системе цитокинов, сохраняющиеся как у лиц на фоне гипотензивной терапии, так без приема препаратов, является потенциальным компонентом системного прогрессирования заболевания с развитием не только классических клинически ассоциированных состояний (инфаркта миокарда, инсульта) [3], но и формированием МС. Повышение содержания M-CSF ассоциировано с ростом количества моноцитов, что на фоне комплексного увеличения IL-1 β , IL-1 α способствует дифференцировке макрофагов в сторону M1 фенотипа с последующим накоплением в жировой ткани, поддержанием воспалительного процесса [4], дисбалансом синтеза адипокинов [5]. Полученные в исследовании данные обосновывают значимость длительных проспективных исследований, направленных на изучение предикторной роли цитокинов при развитии МС.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Global Burden of Metabolic Risk Factors for Chronic Diseases Collaboration. Cardiovascular disease, chronic kidney disease, and diabetes mortality burden of cardiometabolic risk factors from 1980 to 2010: a comparative risk assessment. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2014; 2(8), 634–647.
2. Srikanthan K., Feyh A., Visweshwar H., Shapiro J. I., Sodhi K. Systematic Review of Metabolic Syndrome Biomarkers: A Panel for Early Detection, Management, and Risk Stratification in the West Virginian Population. *Int. J. Med. Sci.* 2016; 13(1), 25–38.

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 factors of myocardial infarction and stroke in patients with essential hypertension. Russian Journal of Immunology. 2015; 9(18). № 1, 93–101.]
4. Nagareddy P. R., Kraakman M., Masters S. L., Stirzaker R. A., Gorman D. J., Grant R. W., Dragoljevic D., Hong E. S., Abdel-Latif A., Smyth S. S., Choi S. H., Korner J., Bornfeldt K. E., Goldberg I. J., Murphy A. J. Adipose tissue macrophages promote myelopoiesis and monocytoysis in obesity. *Cell Metab.* 2014; 19 (5), 821–835.
5. Khalyfa A., Kheirandish-Gozal L., Gozal D. Exosome and Macrophage Crosstalk in Sleep-Disordered Breathing-Induced Metabolic Dysfunction. *Int. J. Mol. Sci.* 2018; 19 (11), 3383–3341.

LEVELS OF PERIPHERAL BLOOD CYTOKINES AND THE RISK FOR METABOLIC SYNDROME IN PATIENTS WITH STAGE II ESSENTIAL HYPERTENSION

© 2019 O. A. Radaeva^{1*}, A. S. Simbirtsev²

*E-mail: radaevamed@mail.ru

¹National Research Mordovia State University, Saransk, Russia;

²State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, FMBA, St. Petersburg, Russia

Received: 11.03.2019. **Accepted:** 21.03.2019

The aim of this study was to investigate a correlation between the levels of IL-1 β , IL-1 α , IL-1ra, IL-18, IL-18BP, IL-37, IL-6, sIL-6r, LIF, sLIFr, IGF-1, IGFBP-1, TNF- α /sTNF-RI, sVCAM-1, IL-17, IL-2, IL-4, IL-10, TGF- β 1, IL-8, CX3CL1, CXCL10, INF γ , M-CSF, IL-34, VEGF-A, EPO in the peripheral blood of patients with stage II EH and the rate of metabolic syndrome (MS) occurring in a 5-year follow-up period. Twenty-eight cytokines were measured using ELISA in the peripheral blood samples of 200 patients with stage II EH. The patients were followed up for 5 years to keep track of MS. The multivariate Cox regression analysis was applied to the following parameters: IL-1 β >20,3 pg/ml; LIF>9,13 пг/мл; M-CSF>4538 pg/ml; IGF-1<116000 pg/ml. The analysis revealed that M-CSF>453 pg/ml ($p < 0.001$) and IGF-1<116000 pg/ml ($p < 0.001$) correlated with an increase in the risk for MS in stage II EH.

Key words: essential hypertension, metabolic syndrome, cytokines

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., Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Doctor of Medical Sciences, Professor, State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, FMBA, St. Petersburg, Russia.

ВЛИЯНИЕ КОНДИЦИОННЫХ СРЕД МАКРОФАГОВ НА ФЕНОТИП И ПРОЛИФЕРАЦИЮ КЛЕТОК ЛИНИИ НЕЙРОБЛАСТОМЫ ЧЕЛОВЕКА SH-SY5Y

©2019 г. И. М. Рашупкин*, М. А. Тихонова, Т. В. Тыринова, Л. В. Сахно, Е. Я. Шевела

*E-mail: iwwwanbets@mail.ru

ФГБНУ «НИИ фундаментальной и клинической иммунологии»,
Новосибирск, Россия

Поступила: 15.03.2019. Принята: 03.04.2019

В работе исследовано влияние кондиционных сред M1 и M2 макрофагов на фенотип и пролиферацию клеток линии нейробластомы человека SH-SY5Y. Установлено, что кондиционные среды M2-макрофагов, генерируемых в присутствии ГМ-КСФ в условиях дефицита ростовых факторов, оказывают выраженный стимулирующий эффект на пролиферацию клеток линии SH-SY5Y. Уровень экспрессии CD271, низкоаффинного рецептора к фактору роста нервов (NGF), коррелирует с морфологией клеток: в культурах с преобладанием нейроноподобных клеток («N-type») количество CD271⁺ клеток значительно больше по сравнению с культурами, где преобладают клетки с морфологией мезенхимальных/стромальных клеток («S-type»). Получены предварительные данные, свидетельствующие о выраженных гуморальных нейропротективных эффектах M2 макрофагов.

Ключевые слова: M1 и M2 макрофаги, кондиционные среды, линия нейробластомы человека SH-SY5Y

DOI: 10.31857/S102872210006548-7

Адрес: 630091 Новосибирск, ул. Ядринцевская 14 ФГБНУ «НИИ фундаментальной и клинической иммунологии», Новосибирск, лаборатория клеточной иммунотерапии, Рашупкин Иван Михайлович.
Тел./факс: +7(383) 2282101
E-mail: iwwwanbets@mail.ru

Авторы:

Рашупкин И. М., ординатор 2-го года обучения ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», Новосибирск, Россия;

Тихонова М. А., к.б.н., старший научный сотрудник, лаборатория клеточной иммунотерапии, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», Новосибирск, Россия;

Тыринова Т. В., к.б.н., научный сотрудник лаборатории клеточной иммунотерапии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», Новосибирск, Россия;

Сахно Л. В., к.б.н., старший научный сотрудник, лаборатория клеточной иммунотерапии, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», Новосибирск, Россия;

Шевела Е. Я., д.м.н., ведущий научный сотрудник, лаборатория клеточной иммунотерапии, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», Новосибирск, Россия.

ВВЕДЕНИЕ

Клетки микроглии и макрофаги (Mφ) играют важную роль в регуляции нейрорегенеративных процессов, при этом регенеративным потенциалом обладают Mφ 2 типа (M2), характеризующиеся противовоспалительными нейропротективными эффектами, в то время как M1 макрофаги могут проявлять нейродеструктивные свойства [1]. В качестве одного из ведущих механизмов регенеративной активности макрофагов рассматривается их способность продуцировать широкий спектр цитокинов и ростовых / трофических факторов.

Целью данной работы явилась оценка влияния кондиционных сред M1 и M2 макрофагов на фенотип и пролиферативную активность клеток линии нейробластомы человека SH-SY5Y.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клетки линии SH-SY5Y культивировали в среде DMEM/F12 с 15% FCS, обновляя сре-

ду каждые 3–4 дня. Для оценки пролиферативной активности клетки линии культивировали в плоскодонных 96-луночных планшетах в концентрации 10^4 /луночку в течение 24, 48 и 72 ч в условиях, модулирующих *in vitro* ишемию (2% FCS). Кондиционную среду (КС) М1 и М2 макрофагов добавляли в лунки в количестве 50% (v/v). В качестве М1 использовали ГМ-КСФ-дифференцированные Мф, генерированные из моноцитов крови здоровых доноров в течение 7 сут; М2 получали при культивировании моноцитов в течение 7 сут в условиях дефицита ростовых факторов [2]. Пролиферативную активность клеток SH-SY5Y оценивали по включению ^3H -тимидина. Относительное содержание $\text{CD}271^+$ клеток определяли при помощи проточной цитометрии.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Через 72 ч культивирования в условиях, модулирующих ишемию, т.е., с 2% FCS, уровень пролиферативного ответа клеток линии SH-SY5Y снижался на 44% по сравнению с нормальным содержанием сыворотки (15% FCS) – в среднем с 4460 до 3080 имп/мин. Культивирование клеток SH-SY5Y в присутствии КС М1 и М2 макрофагов в течение 72 ч приводило к увеличению пролиферативного ответа, уровень которого в результате превышал уровень пролиферации в культурах с 15% FCS. При этом стимулирующий эффект КС М2 макрофагов превышал таковой у КС М1 – индекс стимуляции 4,6 vs 2,3. Исследование временной динамики стимулирующего эффекта КС М2 макрофагов показало, что увеличение уровня пролиферации клеток SH-SY5Y наблюдалось уже через 24 ч культи-

вирования (11360 vs 8120 имп/мин в контроле), с последующим нарастанием эффекта через 48 ч (19650 vs 8200 имп/мин) и 72 ч (38580 vs 14480 имп/мин). Анализ экспрессии CD271, низкоаффинного рецептора к фактору роста нервов (NGF) [3], выявил низкий уровень экспрессии (4%) в культурах SH-SY5Y, большая часть которых имела морфологию «S-типа» (мезенхимальные/стромальные клетки). В культурах с преобладанием клеток «N-типа» (нейроноподобные) количество $\text{CD}271^+$ клеток значительно возрастало (до 33%). Полученные данные позволяют заключить, что 1) КС М2 и М1 макрофагов оказывают стимулирующий эффект на пролиферацию клеток линии SH-SY5Y; 2) способность КС-М2 усиливать пролиферацию клеток линии SH-SY5Y превышает аналогичную активность М1 макрофагов; 3) стимулирующий эффект КС-М2 проявляется уже через 24 ч, достигая максимума через 72 ч культивирования; 4) экспрессия CD271 возрастает при увеличении доли нейроноподобных клеток, т.е. ассоциирована с морфологией клеток.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Hu X., Leak R.K., Shi J., Suenaga J., Gao Y., Zheng P., Chen J. Microglial and macrophage polarization – new prospects for brain repair. *Nat Rev Neurol.* 2015,11(1), 56–64.
2. Sakhno L.V., Shevela E.Ya., Tikhonova M.A., Ostannin A.A., Chernykh E.R. *Scandinavian journal of Immunology.* 2015. 83, 151–159.
3. Ferlemann F.C., Menon V., Condurat A.L., Rößler J., Pruszek J. Surface marker profiling of SH-SY5Y cells enables small molecule screens identifying BMP4 as a modulator of neuroblastoma differentiation. *Sci Rep.* 2017, 7(1), 1–14.

**EFFECT OF MACROPHAGE CONDITION MEDIA ON PHENOTYPE
AND PROLIFERATION OF HUMAN NEUROBLASTOMA CELL LINE SH-SY5Y**

© 2019 I. M. Rashchupkin*, M. A. Tikhonova, T. V. Tyrinova,
L. V. Sakhno, E. Ya. Shevela

*E-mail: iwwwanbets@mail.ru

Federal Budget Institution of Science «Research Institute of Fundamental
and Clinical Immunology», Novosibirsk, Russia;

Received: 15.03.2019. Accepted: 03.04.2019

The study investigated the effect of conditioned media of M1 and M2 macrophages on the phenotype and proliferation of the human neuroblastoma cell line SH-SY5Y. It has been established that conditioned media of M2 macrophages, generated in the presence of GM-CSF under deficiency of growth factors, have a pronounced stimulating effect on the SH-SY5Y cell proliferation. The expression of the low-affinity nerve growth factor receptor, CD271, correlates with cell morphology: in cultures with a predominance of N-type cells, the number of CD271⁺ cells is significantly higher compared to cultures dominated by S-type cells.

Key words: M1 and M2 macrophages, macrophage-conditioned medium, neuroblastoma cell line SH-SY5Y

Authors:

Rashchupkin I. M., ✉ second year resident of the Laboratory of Cellular Immunotherapy of Federal Budget Institution of Science «Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russia. E-mail: iwwwanbets@mail.ru;

Tikhonova M. A., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russia;

Tyrinova T. V., PhD (Medicine), Research Associate, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russia;

Sakhno L. V., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russia;

Shevela E. Ya., PhD, MD (Medicine), Leading Research Associate, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russia.

УРОВЕНЬ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ У ПАЦИЕНТОВ С ПОСЛЕОПЕРАЦИОННЫМ ГИПОТИРЕОЗОМ, ОСЛОЖНЕННЫМ ГИДРОПЕРИКАРДОМ

© 2019 г. И. И. Рыбчинская¹, К. М. Иванов², Е. В. Ермолина²,
Н. Г. Шкатова^{2*}

*E-mail: natasha_shkatova@mail.ru

¹НУЗ «Отделенческая клиническая больница на ст. Оренбург ОАО «РЖД», Оренбург, Россия;

²ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» Минздрава РФ,
Оренбург, Россия

Поступила: 18.02.2019. Принята: 01.03.2019

У 46 женщин из 136 (средний возраст $48,0 \pm 2,3$ лет), прооперированных по поводу узлового зоба, до операции был выявлен перикардиальный выпот и повышенный уровень содержания ИЛ-6 и ФНО- α в сыворотке крови. После операции по мере нарастания объёма гидроперикарда наблюдалось увеличение содержания цитокинов в сыворотке крови с прямой корреляционной связью ($r=0,39$; $p<0,05$) между ФНО- α и объёмом выпота в перикардиальной полости.

Ключевые слова: послеоперационный гипотиреоз, гидроперикард, цитокины, ИЛ-6, ФНО- α

DOI: 10.31857/S102872210006548-7

Адрес: 460000 Оренбург, ул. Правды, 22, кв. 7. ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, Шкатова Наталья Геннадьевна.
Тел.: 8 932 841 70 02 (моб.)

E-mail: natasha_shkatova@mail.ru

Авторы:

Рыбчинская И. И., к.м.н., заместитель главного врача по поликлинической работе НУЗ «Отделенческая клиническая больница на ст. Оренбург ОАО «РЖД», Оренбург, Россия;

Иванов К. М., д.м.н., профессор, заведующий кафедрой пропедевтики внутренних болезней ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, Оренбург, Россия;

Ермолина Е. В., к.б.н., старший научный сотрудник проблемной лаборатории ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, Оренбург, Россия;

Шкатова Н. Г., ассистент кафедры пропедевтики внутренних болезней ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, Оренбург, Россия.

АКТУАЛЬНОСТЬ

Развитие послеоперационного гипотиреоза является одним из наиболее частых негативных последствий оперативного лечения узловой патологии щитовидной железы. Дефицит тиреоидных гормонов отрицательно сказывается на сердечно-сосудистой системе и часто является причиной нарушения ритма сердца

и проводимости, развития диастолической дисфункции сердца и сердечной недостаточности, а также образования выпота в перикардиальной полости. Недостаточность гормонов в совокупности с иммунологическими нарушениями могут способствовать ухудшению структурно-функциональных изменений сердца после операции, приводя к появлению и увеличению жидкости в полости перикарда.

Цель исследования. Изучить динамику уровня цитокинов при послеоперационном гипотиреозе и выявить их связь с увеличением жидкости в полости перикарда.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Проведено динамическое наблюдение 136 женщин, подвергшихся оперативному лечению узлового зоба на базе хирургического отделения НУЗ «ОКБ на ст. Оренбург ОАО «РЖД». Возраст пациентов составил от 25 до 65 лет (средний возраст $48,0 \pm 2,3$ лет). Критериями исключения у больных являлись ИБС, нарушения сердечного ритма (фибрилляция предсердий), пороки сердца, диффузные заболевания соединительной ткани, сахарный диабет, почечная и печёночная недостаточность. В 33% случаев (46 человек) до

операции наблюдался перикардиальный выпот. Эти пациенты были разделены на две группы, сопоставимые по возрасту, клинической картине и иммунному статусу. Первую группу составили больные с эутиреозом и гидроперикардом. Вторую – больные, имеющие сочетание гипотиреоза и перикардиального выпота. Динамическое наблюдение проводилось в дооперационном периоде и через 6 месяцев после операции. Объём жидкости в перикардиальной полости до и после оперативного лечения подтверждалось данными трансторакальной эхокардиографии (ЭхоКГ) на аппарате «PhillipsEnVisor» (США). Для оценки иммунного статуса определялся уровень цитокинов (ИЛ-6, ФНО- α) с помощью наборов «Цитокин» (Санкт-Петербург). Иммунологические показатели определялись до и через 6 месяцев после операции. Для статистической обработки материала использовался пакет прикладных статистических программ EXCEL 7.0. Для выявления связей между показателями проведен ранговый корреляционный анализ с расчетом коэффициента Ch. Spearman. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В дооперационном периоде толщина эхонегативного пространства полости перикарда была выше у больных гипотиреозом и составила $4,5 \pm 0,7$ мм в сравнении с $4,01 \pm 0,49$ мм у пациентов с эутиреозом. Наличие тиреоидного дефицита способствовало усугублению негативных изменений клинико-гемодинамических параметров, увеличению перикардиального выпота.

Через 6 месяцев после операции у данной группы женщин наблюдалась структурная перестройка сердца, продолжали ухудшаться временные параметры диастолической функции сердца. На фоне дефицита тиреоидных гормонов увеличилась ширина эхонегативного пространства перикардиального выпота до $5,2 \pm 0,5$ мм.

В группе больных эутиреозом через 6 месяцев после оперативного вмешательства наблюдались начальные признаки ремоделирования сердца, нарастает объём выпота в полость перикарда до $4,5 \pm 0,92$ мм.

Анализ уровня цитокинов до оперативного вмешательства у всех пациентов с гидропери-

кардом показал повышенный уровень ИЛ-6 и ФНО- α по сравнению с больными без перикардиального выпота. В группе женщин с эутиреозом содержание ФНО- α составило $0,15 (0,11; 0,86)$ пкг/мл, а ИЛ-6 – $0,08 (0,04; 0,11)$ пкг/мл. В группе пациентов с гипотиреозом – $3,47 (0,04; 9,09)$ пкг/мл и $0,37 (0,04; 0,67)$ пкг/мл соответственно ($p < 0,05$).

После оперативного лечения по мере нарастания гидроперикарда у больных всех групп наблюдалось повышение содержания цитокинов в крови. Уровень ФНО- α и ИЛ-6 возрос до $0,18 (0,05; 2,75)$ пкг/мл и $8,58 (0,11; 15,86)$ пкг/мл в 1 группе. Во 2 группе произошло повышение ФНО- α до $5,29 (0,3; 2,66)$ пкг/мл и ИЛ-6 до $3,11 (0,08; 25,09)$ пкг/мл ($p < 0,05$). В результате проведенного корреляционного анализа установлена прямая корреляционная связь между уровнем ФНО- α и выпотом в перикардиальную полость в послеоперационном периоде ($r_s = 0,39; p < 0,05$).

Таким образом, оперативное лечение узловой патологии щитовидной железы приводит к увеличению содержания провоспалительных цитокинов и объёма перикардиального выпота у больных, имевших гидроперикард до операции. Выявлена прямая корреляционная связь между нарастанием уровня содержания ФНО- α и объёмом выпота в перикардиальной полости в послеоперационном периоде.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Будневский А. В., Бурачак В. Т., Грекова Т. И. Гипотиреоз и сердечно-сосудистая патология. Клиническая тиреодология. 2004, 2(2), 7–14. [Budnevsky A. V., Burlachuk V. T., Grekova T. I. Hypothyroidism and cardiovascular pathology. Clinical thyroidology. 2004, 2(2), 7–14].
2. Дранник Г. Н. Клиническая иммунология и аллергология. М.: ООО «Медицинское информационное агентство». 2003, 604. [Drannik G. N. Clinical immunology and allergology. Moscow.: LLC Medical Information Agency, 2003, 604].
3. Палеев Н. П., Палеев Ф. Н. Цитокины и их роль в патогенезе заболеваний сердца. Клиническая медицина. 2004, 5, 4–7. [Paleev N. P., Paleev F. N. Cytokines and their role in pathogenesis of heart diseases. Clinical medicine. 2004, 5, 4–7].
4. Петунина Н. А. Сердечно-сосудистые осложнения гипотиреоза. // Врач. 2007, 4, 2–5. [Petunina N. A. Cardiovascular complications of hypothyroidism. Doctor. 2007, 4, 2–5].

**THE LEVEL OF PROINFLAMMATORY CYTOKINES IN PATIENTS
WITH POSTOPERATIVE HYPOTHYRHYOSIS COMPLICATED
BY HYDROPERICARD**

© 2019 I. I. Rybchinskaya¹, K. M. Ivanov², E. V. Ermolina²,
N. G. Shkatova^{2*}

*E-mail: natasha_shkatova@mail.ru

¹Departmental Clinical Hospital at st. Orenburg Russian Railways, Orenburg, Russia;

²Orenburg State Medical University, Orenburg, Russia

Received: 18.02.2019. **Accepted:** 01.03.2019

In 46 women out of 136 (mean age 48.0 ± 2.3 years) who were operated on for a nodular goiter, a pericardial effusion and elevated serum levels of IL-6 and TNF- α were detected before the operation. After the operation, as the volume of hydropericardium increased, an increase in the serum cytokine content was observed with a direct correlation ($r = 0.39$; $p < 0.05$) between TNF- α and the volume of effusion in the pericardial cavity.

Key words: postoperative hypothyroidism, hydropericardium, cytokines, IL-6, TNF- α

Authors:

Rybchinskaya I. I., Candidate of Medical Sciences, deputy chief for polyclinic work, NUZ «Departmental Clinical Hospital at st. Orenburg Russian Railways» Orenburg, Russia;

Ivanov K. M., Doctor of Medicine, Professor, Head of the department of propedeutics of internal diseases of the FGBOU OrgMU of the Ministry of Health of Russia, Orenburg, Russia;

Ermolina E. V., Candidate of Biological Sciences, senior researcher of the problem research laboratory of the FGBOU OrGMU of the Ministry of Health of Russia, Orenburg, Russia;

Shkatova N. G., ✉ Assistant of the Department of Internal Medicine Propaedeutics of the FGBOU OrgMU of the Ministry of Health of Russia, Orenburg, Russia. **E-mail:** natasha_shkatova@mail.ru

БЕЛКОВЫЕ ЭКСТРАКТЫ ИЗ БОБОВ СОИ И АРАХИСА: ФРАКЦИОННЫЙ СОСТАВ И АЛЛЕРГЕННЫЕ СВОЙСТВА

© 2019 г. П. В. Самойликов*, В. М. Бержец

*E-mail: samoilikov@mail.ru

ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова, Министерство науки
и высшего образования Российской Федерации, Москва, Россия

Поступила: 15.03.2019. Принята: 28.03.2019

Соя и арахис относятся к наиболее сильным пищевым аллергенам среди всех бобовых растений. На сегодняшний день аллергены этих бобовых по ряду причин остаются недостаточно доступными в клинической практике. В связи с этим целью работы было получение белковых экстрактов из сои и арахиса и оценка их биохимических и аллергенных свойств. Получение раствора белково-полисахаридных комплексов проводили методом водно-солевой экстракции, определение содержания белка проводили методом Бредфорда, изучение белкового состава проводили методом вертикального электрофореза в полиакриламидном геле. Изучение аллергенных свойств проводили методом торможения связывания sIgE. В полученных белковых экстрактах были охарактеризованы белки, которые по молекулярной массе относятся к аллергенам кукурузной, проламиновой, профилиновой фракциям белков и betv 1 подобным белкам. Проведенное исследование отдельных белковых фракций и дальнейшее сопоставление их аллергенных свойств существенно дополнит компонентную диагностику, которая активно внедряется в клиническую практику.

Ключевые слова: аллергены, соя, арахис, белковые экстракты

DOI: 10.31857/S102872210006547-6

Адрес: 105064, Москва, Малый Казенный переулок, д. 5а.
ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова,
лаборатория аллергодиагностики, Самойликов Павел Владимирович. Тел.(моб.): 89267074152.

E-mail: samoilikov@mail.ru

Авторы:

Самойликов П. В., к.м.н., с.н.с. лаборатории аллергодиагностики ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова, Москва, Россия;

Бержец В. М., д.б.н., зав. лаб. по разработке аллергенов ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова, Москва, Россия.

В настоящее время продукты из бобовых культур широко используются в пищевой промышленности, среди которых соя и арахис представляют наибольший интерес из-за высокого содержания белков, жиров и микроэлементов. В то же время эти бобы содержат большое количество аллергенов, которые помимо прямой реакции гиперчувствительности, могут вступать в перекрестные взаимодействия с аллергенами других растений за счет структурной гомологии. Аллергены сои и арахиса по своей структуре и аминокислотному составу могут быть сгруппированы в несколько семейств и су-

персемейств белков, внутри которых возможны IgE-перекрестные реакции: купины, проламины, профилины и betv 1 подобные белки [1].

В связи с этим соя и арахис относятся к наиболее активным пищевым аллергенам среди всех бобовых растений и были включены в состав продуктов питания, вызывающих самую высокую частоту пищевой аллергии в Европе [2]. Кроме того, аллергены сои и арахиса относительно устойчивы к термальной обработке и для снижения их аллергенных свойств требуется длительное кипячение [3]. При этом было показано, что обжарка арахиса (основной вид его термической обработки) напротив увеличивает способность аллергенов связывать sIgE [4].

На сегодняшний день нет отечественных аллергенных экстрактов из сои и арахиса для кожного тестирования. В связи с этим целью работы было получение белковых экстрактов из сои и арахиса и оценка их биохимических и аллергенных свойств.

В работе использовали соевые бобы *Glycine max* и семена арахиса *Arachis hypogaea*. Получение белково-полисахаридных комплексов сои

и арахиса проводили в несколько этапов. В начале семена измельчали до получения соевой муки и гомогенной арахисовой массы. Далее мы проводили обезжиривание добавлением диэтилового эфира с последующим перемешиванием и инкубацией. Получение раствора белково-полисахаридных комплексов проводили методом Эванса-Кока. После этого аллергенный экстракт центрифугировали с последующим отделением супернатанта и проведением стерилизующей фильтрации.

Определение содержания белка проводили методом Бредфорда. Изучение белкового состава полученных экстрактов проводили методом вертикального электрофореза по Леммли [5].

Аллергенную активность экстрактов сои и арахиса оценивали в реакции ингибирования связывания sIgE с соответствующими аллергенами системы ImmunoCAP (Phadia, Швеция), принятыми нами как стандарт. Использовали пуловую сыворотку от 4 больных с сенсibilизацией к сое и арахису (2–3 класс). Для этого пуловую сыворотку инкубировали в течение часа при комнатной температуре с различными концентрациями сои и арахиса, а потом определяли содержание sIgE к этим аллергенам. Концентрация белка в экстракте сои составила 1,332 мг/мл, в экстракте арахиса – 1,98 мг/мл.

При электрофоретическом разделении бобовых экстрактов были выявлены несколько белковых фракций, которые по молекулярной массе (м.м.) согласно международной номенклатуре ВОЗ/WHO/IUIS можно отнести к аллергенам. Белки сои с м.м. 48 кДа и с м.м. 55 кДа могут представлять собой аллергены glym 5 и glym 6, соответственно. Белки арахиса с м.м. 64 кДа и 60,3 кДа могут быть отнесены к аллергенам arah 1 и arah 3, соответственно. Эти белки относятся к 7S и 11S глобулинам и принадлежат к одному суперсемейству белков купингов.

Белки сои с м.м. 7 кДа и 12 кДа относятся к Glym 1 и Glym 8, соответственно. Белки арахиса с м.м. 17 кДа, 15 кДа, 10 кДа, 8,5 кДа и 11 кДа могут являться arah 2, arah 6 и 7, arah 9, arah 16 и arah 17, соответственно. В связи с тем, что аллергены arah 6 и arah 7 имеют примерно одинаковую м.м., на электрофореграмме они получились в виде одной широкой полосы. Похожая картина представлена для аллергенов arah 9, arah 16 и arah 17, они имеют незначительные отличия в м.м. и выглядят как широкая белковая полоса. Эти белки сои и арахиса относятся к суперсемейству проламинов.

Среди профилиновых белков на электрофореграмме видна фракция сои с м.м. 14 кДа и фракция арахиса с м.м. 15 кДа, которые могут быть аллергенами glym 3 и arah 5, соответственно.

К betv 1 подобным белкам относятся glym 4 сои и arah 8 арахиса, которые можно идентифицировать на нашей электрофореграмме как белковые полосы на дорожках разделения сои и арахиса с м.м. 17 кДа. В связи с тем, что arah 8 и arah 2 имеют одинаковую м.м., на электрофореграмме они представлены в виде одной полосы.

Полученные экстракты из бобов сои и арахиса обладали высокой аллергенной активностью сравнимой с таковой с аллергенами в системе ImmunoCAP в 73,1% и 76%, соответственно.

Таким образом, были получены два белковых экстракта, в состав которых входят суперсемейства белков, обладающие выраженными аллергенными свойствами.

Имеются данные, что аллергены, входящие в состав одного суперсемейства или семейства, обладают сходством в 2-мерной и 3-мерной структуре белков или в аминокислотной последовательности, в том числе и для IgE-эпитопов. Проведенное исследование отдельных белковых фракций сои и арахиса, и сопоставление их аллергенных свойств существенно дополнит компонентную диагностику, которая активно внедряется в клиническую практику.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. *Heimo Breiteneder*. Allergen families and databases // *Molecular Allergology Users Guide* Published by the European Academy of Allergy and Clinical Immunology. 2016, 57–67.
2. *Nwaru B. I., Hickstein L., Panesar S. S., Roberts G., Muraro A., Sheikh A.* EAACI Food Allergy and Anaphylaxis Guidelines Group. Prevalence of common food allergies in Europe: a systematic review and meta-analysis. *Allergy*. 2014, 69(8), 992–1007.
3. *Cabanillas B., Cuadrado C., Rodriguez J., Dieguez M. C., Crespo J. F., Novak N.* Boiling and Pressure Cooking Impact on IgE Reactivity of Soybean Allergens. *Int Arch Allergy Immunol*. 2018, 175(1–2), 36–43.
4. *Beyer K, Morrow E, Li XM, Bardina L, Bannon GA, Burks AW, Sampson HA.* Effects of cooking methods on peanut allergenicity. *J Allergy Clin Immunol*. 2001, 107(6), 1077–81.
5. *Остерман Л. А.* Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: Электрофорез и ультрацентрифугирование. М.: Наука, 1981. [*Osterman L. A.* Methods of research of proteins and nucleic acids: Electrophoresis and ultracentrifugation. М.: Science, 1981].

**PROTEIN EXTRACTS FROM BEANS OF SOY AND PEANUT:
FRACTIONAL COMPOSITION AND ALLERGENIC PROPERTIES**

© 2019 P. V. Samoylikov*, V. M. Berzhets

*E-mail: samoilikov@mail.ru

*The Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Ministry of Science
and Higher Education of the Russian Federation, Moscow, Russia*

Received: 15.03.2019. **Accepted:** 28.03.2019

Soybeans and peanuts are the strongest food allergens among all leguminous plants. Today, allergens of these legumes are not sufficiently accessible in clinical practice for a number of reasons. In this regard, the aim of the work was to obtain protein extracts from soybeans and peanuts and to evaluate their biochemical and allergenic properties. The preparation of a solution of protein-polysaccharide complexes was performed by the method of water-salt extraction, the determination of the protein content was carried out by the method of Bradford, the study of the protein composition of the obtained extracts was carried out by the polyacrylamide gel electrophoresis. Allergenic properties were investigated by the method of inhibition of sIgE binding. Proteins were described in the obtained protein extracts. They belong to cupin, prolamin, profilin protein fractions and Bet v 1-like proteins. A study of individual protein fractions and further comparison of their allergenic properties will significantly complement the component diagnostics, which is actively being introduced into clinical practice.

Key words: allergens, soy, peanuts, protein extracts

Authors:

Samoylikov P. V., ✉ PhD, laboratory of allergic diagnosis the Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation, Moscow, Russia. **E-mail:** samoilikov@mail.ru;

Berzhets V. M., PhD, Head of the laboratory of development of allergens the Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation, Moscow, Russia.

ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ЭНДОНУКЛЕАЗЫ НА ВНЕКЛЕТОЧНЫЕ НЕЙТРОФИЛЬНЫЕ ЛОВУШКИ

© 2019 г. И. В. Самусева^{1*}, А. Ю. Савочкина¹, К. В. Никушкина¹,
И. В. Емельянов^{1,2}, Т. И. Никонова¹, М. А. Зотова¹

*E-mail: i.v.samuseva@yandex.ru

¹ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет»
Минздрава России, Челябинск, Россия

²ФГБОУ ВО «Челябинский государственный университет», Челябинск, Россия

Поступила: 15.03.2019. Принята: 02.04.2019

В работе представлены результаты по анализу динамики образования внеклеточных сетей ДНК нейтрофилами, выделенными из периферической крови и их фрагментации. В ходе эксперимента было установлено, что дезоксирибонуклеаза I (ДНКазы I) расщепляет ДНК – основу внеклеточных ловушек. Вероятно, способность секретировать этот ферментный компонент у некоторых патогенных бактерий (*S. pyogenes*, *S. aureus* или *S. pneumoniae*) объясняет их способность к высвобождению из экстрацеллюлярных структур.

Ключевые слова: нейтрофилы, нейтрофильные внеклеточные сети, нейтрофильные ловушки, ДНКазы I

DOI: 10.31857/S102872210006544-3

Адрес: 454092 Челябинск, ул. Воровского, 64, ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, Самусева Ирина Владимировна. Тел.: +79227344234 (моб.).

E-mail: i.v.samuseva@yandex.ru

Авторы:

Самусева И. В., м. н. с. НИИ иммунологии ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России, Челябинск, Россия;

Савочкина А. Ю., д. м. н., профессор кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии и клинической лабораторной диагностики ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, Челябинск, Россия;

Никушкина К. В., к. м. н., в. н. с. НИИ иммунологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, Челябинск, Россия;

Зотова М. А., к. м. н., научный сотрудник НИИ иммунологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, Челябинск, Россия;

Емельянов И. В., старший лаборант НИИ иммунологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, Челябинск, Россия;

Никонова Т. И., старший лаборант НИИ иммунологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, Челябинск, Россия.

ВВЕДЕНИЕ

Нейтрофильные гранулоциты являются ключевыми клетками врожденного иммунитета [1], их основной функцией является уничтожение

патогенных микроорганизмов, таких как бактерии, грибы и паразиты, а также предотвращение их распространения в организме. Это самые многочисленные, но короткоживущие клетки белой крови. Они являются главными в разрушении микробицидных компонентов, а также вирусов [2]. Нейтрофилы оснащены богатым набором рецепторов, которые позволяют чутко и дифференцировано реагировать на малейшие изменения окружающей среды. Они первыми приходят в очаг воспаления, где проявляют разнообразные виды активности [3]. Нейтрофилы могут находиться в двух функциональных состояниях: в редокс-исходном и праймированном. Известно, что активация нейтрофилов периферической крови происходит на фоне праймированного состояния [4]. Праймирующий стимул вызывает метаболическую перестройку, приводящую к активации клетки, следствием его влияния является усиление ответа на последующую активацию. В активированном состоянии нейтрофил может оказывать свое действие на объект, вызвавший его активацию, различными способами: фагоцитировать и уничтожить его в фаголизосомах или выделять наружу бактерицидные продукты, которые представляют собой содержимое гранул [1,3,6]. Открытие

нейтрофильных внеклеточных ловушек (НВЛ) и установление их антимикробного эффекта как важнейшего звена врожденного иммунитета, безусловно, явилось началом нового этапа в исследовании функций нейтрофильных гранулоцитов. Формирование внеклеточных ловушек может осуществляться только активированными нейтрофилами. Эффект антимикробных веществ во внеклеточном пространстве усиливается в структурах НВЛ [7]. Известно, что нейтрофильные внеклеточные ловушки способны захватывать и уничтожать микроорганизмы. Это объясняется тем, что захваченные микробные агенты подвергаются высокой локальной концентрации антимикробных белков, таких как нейтрофильная эластаза, бактерицидный/индуцированный протеин и гистоны. Большинство патогенов уничтожаются после того, как захватываются внеклеточно расположенными сетями ДНК [7], однако есть ряд бактерий способных избегать захвата и киллинга.

Исходя из этого, целью данного исследования было разработать метод разрушения экстрацеллюлярных сетей нейтрофилов, выделенных из периферической крови *in vitro* для дальнейшего изучения влияния различных факторов на процессы деградации внеклеточных сетей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводилось на базе НИИ иммунологии ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России (г. Челябинск). Были обследованы 16 здоровых не беременных женщин. Средний возраст составил $26,5 \pm 3,3$ года. У всех доноров была забрана периферическая венозная кровь в 1 фазу менструального цикла. Критериями включения являлись добровольное согласие на обследование, оформленное в письменном виде. Отсутствие отклонений в нормативных показателях общего гематологического анализа крови, выраженной эндокринной и соматической патологии. Все женщины, принявшие участие в данном эксперименте подтверждали отсутствие приема гормональных препаратов, а также имели концентрации прогестерона, эстрадиола, лютеинизирующего гормона в сыворотке крови в пределах нормального репродуктивного диапазона. У всех женщин проводилось микробиологическое исследование для определения состава микрофлоры половых путей. Методом световой иммерсионной микроскопии подвергались мазки, окрашенные метиленовым синим и по Граму. Для получения

чистой фракции нейтрофилов периферическую венозную кровь забирали у женщин из локтевой вены, добавляли гепарин из расчета 10 ЕД («Гедеон-Рихтер», Hungary) на 10 мл крови. Затем к 2 мл гепаринизированной венозной крови добавляли 3 мл стерильного физиологического раствора (0,9% раствор NaCl), полученную смесь наслаивали на градиент плотности стерильных растворов фиколла-верографина (Pharmacia, Sweden; Spofa, CSSR). Плотность верхнего слоя градиента составляет 1,075–1,077, нижнего – 1,093–1,095. Каждый градиент использовали в объеме 2 мл. Через 40 минут центрифугирования при 1500 об/мин., температуре 4 °С, на границе между градиентами образуется кольцо гранулоцитов с чистотой 98–100%, а на границе между 1,077 градиентом и плазмой крови – кольцо мононуклеаров. Кольцо нейтрофилов аккуратно собирали, переносили в стерильные пластиковые пробирки и отмывали от градиента стерильным раствором Хенкса путём центрифугирования при 1500 об/мин., 4 °С два раза по 7 минут. Клеточную взвесь стандартизовали до концентрации 5×10^6 клеток/мл. Далее полученные аликвоты инкубировали с раствором Хенкса (контроль), клеточными активаторами 4-форбол-12-миристат-13-ацетатом (ФМА) и ДНКазой I. Эндонуклеазу добавляли в разные временные промежутки инкубации при температуре 37 °С градусов. Оценивали процент внеклеточных сетей ДНК на 5, 10, 20, 30, 120 минутах инкубации. Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакета прикладных компьютерных программ Statistica for Windows (v.10.0; Statsoft Inc.). При обработке полученных данных использовали методы описательной статистики и дисперсионный анализ (ANOVA). Парные сравнения в рамках дисперсионного комплекса проводили с использованием критерия достоверно значимой разности Тьюки. Эффекты и межгрупповые различия в дисперсионном анализе считали значимыми при $p < 0,05$. Полученные данные представлены в виде средних значений и их 95%-ных доверительных интервалов (95% ДИ).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе исследования было установлено, что в отсутствие клеточных индукторов и фермента активного роста внеклеточных нитей ДНК не происходит, и не превышает 4%. Минимальное необходимое время для образования внеклеточных сетей в присутствии клеточного

индуктора не микробной природы составляет 15 минут, причем максимальное их значение приходится на 30-минутный интервал и составляет 22%. Установлено, что ДНКаза I фрагментирует ДНК-остов экстрацеллюлярных сетей, что приводит к их разрушению. При инкубации с клеточным активатором и ферментом снижение количества внеклеточных нейтрофильных сетей зависит от продолжительности инкубации с последним, и имеют значимые различия.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, данные настоящего исследования свидетельствуют и подтверждают способность ряда бактерий продуцирующих ДНКазы избегать внутри- и внеклеточного захвата и киллинга внеклеточными ловушками.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Семенов Б. Ф., Зверев В. В. Концепция создания быстрой иммунологической защиты от патогенов. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии, 2007, 4; 93–100. [Semenov B. F., Zverev V. V. The concept of creating a rapid immunological defense against pathogens. Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology, 2007, 4; 93–100.]
2. Herant E. Mechanisms of neutrophil phagocytosis. Journal of cell science 2003, 19; 45–50
3. Скулачев В. П. Кислород в живой клетке: добро и зло, Соросовский образовательный журнал, 1996, 2; 23–27. [Skulachev V. P. Oxygen in a living cell: good and evil, Soros Educational Journal 1996, 2; 23–27].
4. Halliwell B, Gutteridge J., Modulating A. Role for Antioxidants in Desiccation Tolerance/ Halliwell B. Biology 1998, 1 (45); 734–740
5. Гольдштейн Н. И. Активные формы кислорода как жизненно необходимые компоненты воздушной среды. Биохимия, 2002, 67; 194–204. [Goldstein N. I. Active forms of oxygen as vital components of the air environment. Biochemistry 2002, 67; 194–204].
6. Delanty N., Dichter M. Oxidative injury in the nervous system. Acta Neurologica Scandinavica 1998, 9; 145–153.
7. Савочкина А. Ю. Нейтрофильные внеклеточные ловушки: механизмы образования, методы обнаружения, биологическая роль: диссертация доктора медицинских наук. Челябинская государственная медицинская академия.— Челябинск, 2012; 212. [Savochkina A. Y. Neutrophil extracellular traps: mechanisms of formation, detection methods, biological role: dissertation of the doctor of medical sciences. Chelyabinsk State Medical Academy, Chelyabinsk, 2012; 212].

EVALUATION OF THE EFFECT OF ENDONUCLEASE ON EXTRACELLULAR NEUTROPHILIC TRAPS

© 2019 I. V. Samuseva^{1*}, A. Y. Savochkina¹, K. V. Nikushkina¹, I. V. Yemelyanov^{1,2}, T. I. Nikonova¹, M. A. Zotova¹

*E-mail: i.v.samuseva@yandex.ru

¹South Ural Medical State University, Chelyabinsk, Russia

²Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russia

Received: 15.03.2019. Accepted: 02.04.2019

The paper presents the results of the analysis of the dynamics of the formation of extracellular DNA networks by neutrophils isolated from peripheral blood and their fragmentation. During the experiment, it was found that deoxyribonuclease I (DNase I) cleaves DNA – the basis of extracellular traps. The ability to secrete this enzyme component in some pathogenic bacteria (*S. pyogenes*, *S. aureus* or *S. pneumoniae*) probably explains their ability to release from extracellular structures.

Key words: neutrophils, neutrophil extracellular networks, neutrophil traps, DNase I

Authors:

Samuseva I. V., ✉ Junior Researcher, Research Institute of Immunology, South Ural Medical State University, Chelyabinsk, Russia.
E-mail: i.v.samuseva@yandex.ru;

Savochkina A.Y., MD, Professor of the Department of Microbiology, Virology, Immunology and Clinical Laboratory Diagnostics, South Ural Medical State University, Chelyabinsk, Russia;

Nikushkina K. V., PhD, Leading Researcher, Research Institute of Immunology, South Ural Medical State University, Chelyabinsk, Russia;

Zotova M. A., PhD, Researcher, Research Institute of Immunology, South Ural Medical State University, Chelyabinsk, Russia;

Emelyanov I. V., Senior Assistant, Research Institute of Immunology, South Ural Medical State University, Chelyabinsk, Russia;

Nikonova T. I., Senior Assistant, Research Institute of Immunology, South Ural Medical State University, Chelyabinsk, Russia.

ПОПУЛЯЦИОННЫЙ СОСТАВ НЕЙТРОФИЛОВ В УСЛОВИЯХ ТУБЕРКУЛЕЗНОГО ПРОЦЕССА

© 2019 г. Я. В. Сердюк*, Т. А. Ненашева, И. Ю. Никитина,
Н. Л. Карпина, И. В. Лядова

*E-mail: yv_serdyk@mail.ru

ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза»,
Москва, Россия

Поступила: 27.02.2019. Принята: 13.03.2019

Нейтрофилы – первая линия защиты при инфекционных заболеваниях. Вклад нейтрофилов в патогенез туберкулеза противоречив и не до конца изучен. В данном исследовании мы провели анализ гетерогенности популяций нейтрофилов у больных туберкулезом здоровых добровольцев. У больных туберкулезом отмечается увеличение количества нейтрофилов низкой плотности по сравнению со здоровыми добровольцами. Нами было выявлено, что популяция нейтрофилов низкой плотности гетерогенна и содержит субпопуляцию активированных клеток.

Ключевые слова: нейтрофилы, нейтрофилы низкой плотности, туберкулез

DOI: 10.31857/S102872210006543-2

Адрес: 107564 Москва, Яузская аллея 2А/1, ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза», отдел иммунологии, лаборатория биотехнологии, Лядова Ирина Владимировна. Тел: +7(499) 785 90 35.

E-mail: yv_serdyk@mail.ru

Авторы:

Сердюк Я. В., м.н.с. лаборатории биотехнологии ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза», г. Москва, Россия;

Ненашева Т. А., к.б.н., с.н.с. лаборатории биотехнологии ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза», г. Москва, Россия;

Никитина И. Ю., к.м.н. с.н.с. лаборатории биотехнологии ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза», г. Москва, Россия;

Карпина Н. Л., д.м.н. зав. консультативно-поликлиническим отд. ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза», г. Москва, Россия;

Лядова И. В., д.м.н. зав. лабораторией биотехнологии ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза», г. Москва, Россия.

АКТУАЛЬНОСТЬ

Туберкулез (ТБ) – одно из самых распространенных инфекционных заболеваний в мире. Нейтрофилы – важные эффекторные клетки врожденного иммунитета, являющиеся одним из факторов защиты против ТБ. Данные о вкладе нейтрофилов в патогенез ТБ противоречивы, описан вклад нейтрофилов как в протекцию, так и в патогенез [1]. Долгое время нейтрофилы

считались терминально дифференцированными клетками не способными синтезу цитокинов и формированию взаимодействия с компонентами иммунной системы. В последние десятилетия, взгляд на биологию нейтрофилов значительно расширился. В настоящее время доказаны и установлены представления о том, что нейтрофилы могут обладать комплексной активностью, способны участвовать в формировании иммунного ответа, путем секреции про- и противовоспалительных, иммунорегуляторных цитокинов и способны к созданию комплексных взаимодействий с компонентами врожденной и адаптивной иммунной системы. Еще одним аспектом «новой» биологии нейтрофилов, является описанная в литературных данных гетерогенность популяций нейтрофилов при различных патологических и физиологических состояниях. Физиологическая гетерогенность нейтрофилов обусловлена процессами старения циркулирующей популяции и изменением рецепторного профиля нейтрофилов, мигрировавших в ткани. При различных патологических состояниях описаны «субпопуляции» нейтрофилов отличающиеся фенотипически и функционально: нейтрофилы, ассоциированные с опухолью (TAN) [2]; миелоидные супрессорные клетки (MDSC) [3]; ТБ-ассоциированные нейтрофилы (TBAN) [4],

нейтрофилы низкой плотности (LDN) [5]. Популяцию LDN обнаруживают среди фракции мононуклеаров, после выделения последней на градиенте плотности, в крови пациентов с аутоиммунными заболеваниями, раком, сепсисом, псориазом, ВИЧ и др. LDN характеризуются экспрессией маркеров нейтрофилов CD66b, CD15, но отличаются от остальных популяций низкой плавучей плотностью. Сообщалось, что увеличение количества LDN коррелирует с активностью и тяжестью таких заболеваний как астма, ВИЧ-инфекция, аутоиммунные заболевания, сепсис, псориаз. Комплексные исследования популяции нейтрофилов при ТБ, ее гетерогенности, изменения фенотипических и функциональных характеристик в условиях туберкулезного процесса не проводились.

Целью данной работы явилось исследование популяционного состава нейтрофилов в условиях активного туберкулеза.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследовано 15 больных туберкулезом легких, получающих лечение в ФГБНУ «ЦНИИТ», и 10 здоровых добровольцев. От всех участников исследования были получены образцы крови. Мононуклеары и гранулоциты (далее «типичные нейтрофилы») получали путем выделения на градиенте плотности фикола. LDN идентифицировали в осадке мононуклеаров по экспрессии маркера CD66b⁺. В каждой популяции с использованием проточной цитометрии анализировали экспрессию различных маркеров миелоидных клеток (CD66, CD14, CD15, HLA-DR, CD11b и других). Помимо этого оценивали фагоцитарную активность популяций, с использованием теста PHAGOTEST™ (BD Biosciences, USA). В работе использовали антитела производства BD Bioscience, eBioscience, BioLegend. Основными методами исследования являлись: проточная цитометрия (прибор FACSCANTOII (BD Biosciences, USA; программные обеспечения BD FACSDIVA (BD Biosciences, USA) и FlowJo (TreeStar, Ashland, OR)); гемоцитометрия (BeckmanCoulter, Brea, USA). Полученные данные анализировали с использованием U-критерия Манна-Уитни (GraphPadSoftware).

РЕЗУЛЬТАТЫ

У больных туберкулезом легких в сравнении со здоровыми добровольцами отмечалось достоверно большее количество LDN нейтрофилов низкой плотности, характеризующихся фено-

типом CD66b⁺CD14⁻ (4.6 и 2.1, соответственно, $p < 0.01$). Фенотипическая характеристика показала, что LDN и «типичные нейтрофилы» характеризуются экспрессией маркеров CD15, CD11b, CD33, отсутствием экспрессии HLA-DR. По сравнению с «типичными нейтрофилами» популяция LDN характеризовалась более низкой экспрессией маркера CD62L и достоверно большим количеством клеток MPO^{low} ($p < 0.01$). Среди популяции LDN обнаружено достоверно больше клеток с фенотипом CD16^{low}CD10⁻ ($p < 0.01$). Анализ фагоцитарной активности показал, что популяция типичных нейтрофилов и популяция LDN обладают высокой фагоцитарной активностью, более 75% клеток фагоцитировали *E.coli*.

ОБСУЖДЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Полученные данные свидетельствуют об изменении популяционного состава нейтрофилов в условиях активного ТБ. Популяции LDN и «типичных нейтрофилов» гетерогенны и состоят из двух субпопуляций: зрелой с фенотипом CD16⁺CD10⁺, незрелой CD16^{low}CD10⁻, описываемой в литературе как популяция клеток, недавно вышедших из костного мозга. Проведенный анализ поднимает вопрос о происхождении и возможной роли различных субпопуляций нейтрофильных клеток при туберкулезном процессе, для ответа на этот вопрос проводятся дальнейшие исследования.

Работа поддержана НИР УИН 0515–2019–0018.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Almeida F. M., Ventura T. L., Amaral E. P., Ribeiro S. C., Calixto S. D., Manhães M. R., Rezende A. L., Souza G. S., et al. (2017). "Hypervirulent Mycobacterium tuberculosis strain triggers necrotic lung pathology associated with enhanced recruitment of neutrophils in resistant C57BL/6 mice". *PloS one*, 12(3): e0173715
2. Singhal S., Bhojnagarwala P. S., O'Brien S., Moon E. K., Garfall A. L., Rao A. S., Quatromoni J. G., Stephen T. L., Litzky L., Deshpande C., et al. (2016). "Origin and role of a subset of tumor-associated neutrophils with antigen-presenting cell features in early-stage human lung cancer". *Cancer Cell*, 30(1):120–135
3. Tsiganov E. N., Verbina E. M., Radaeva T. V., Sosunov V. V., Kosmiadi G. A., Nikitina I. Y. and Lyadova I. V. (2014). "Gr-1dimCD11b⁺ immature myeloid-derived suppressor cells but not neutrophils are markers of lethal tuberculosis infection in mice". *The Journal of Immunology*, 192(10):4718–4727.
4. Lyadova I. V. (2017). "Neutrophils in Tuberculosis: Heterogeneity Shapes the Way?" *Mediators of Inflammation*, 2017:8619307

5. Deng Y., Ye J., Luo Q., Huang Z., Peng Y., Xiong G., et al. (2016). "Low-density granulocytes are elevated in mycobacterial infection and associated with the severity of tuberculosis". PloS one, 11(4): e0153567.

POPULATION COMPOSITION OF NEUTROPHILS IN THE TUBERCULOUS PROCESS

© 2019 Y. V. Serdyuk*, T. A. Nenasheva, I. Yu. Nikitina,
N. L. Karpina, I. V. Lyadova

*E-mail: yv_serdyk@mail.ru

Central tuberculosis research institute, Moscow, Russia

Received: 27.02.2019. Accepted: 13.03.2019

Neutrophils are the first line of defense against infectious diseases. The contribution of neutrophils to the pathogenesis of tuberculosis is controversial and not fully understood. In this study, we analyzed the heterogeneity of neutrophil populations in patients with tuberculosis and control subjects. In patients with tuberculosis, there is an increase in the number of low-density neutrophils compared with control subjects. We have found that the low-density neutrophil population is heterogeneous and contains a subpopulation of activated cells.

Key words: neutrophils, low-density neutrophils (LDNs), tuberculosis

Authors:

Serdyuk Y. V., ✉ PhD student, Junior Staff Researcher Laboratory of biotechnology Central Tuberculosis Research Institute, Moscow, Russia. E-mail: yv_serdyk@mail.ru;

Nenasheva T. A., PhD, Senior Staff Researcher Laboratory of biotechnology Central Tuberculosis Research Institute, Moscow, Russia;

Nikitina I. Yu., PhD, Senior Staff Researcher Laboratory of biotechnology Central Tuberculosis Research Institute, Moscow, Russia;

Karpina N. L., Doctor of Medical Sc., Head of the Consultative department Central Tuberculosis Research Institute, Moscow, Russia;

Lyadova I. V., Doctor of Medical Sc., Head of the Laboratory of biotechnology Central Tuberculosis Research Institute, Moscow, Russia.

РОЛЬ В1 И В2 ЛИМФОЦИТОВ В ФОРМИРОВАНИИ РАЗЛИЧНЫХ ВАРИАНТОВ РЕВМАТОИДНОГО АРТРИТА

© 2019 г. Л. П. Сизякина*, М. В. Харитонова

*E-mail: msizjakina@mail.ru

ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет»
Минздрава РФ, Ростов-на-Дону, Россия

Поступила: 14.02.2018. Принята: 25.02.2019

Представлены результаты фенотипической характеристики В1 и В2 лимфоцитов пациентов с серопозитивным и серонегативным вариантами течения суставной формы ревматоидного артрита. Показано увеличение содержания В1 лимфоцитов как при серонегативном, так и при серопозитивном вариантах. Отличительной особенностью В2 лимфоцитов при серопозитивном-варианте по сравнению с серонегативным является усиление процессов активации и снижение интенсивности апоптоза по мере увеличения активности аутоиммунного процесса.

Ключевые слова: В1 и В2 лимфоциты, иммунофенотип В-клеток, ревматоидный артрит, суставная форма

DOI: 10.31857/S102872210006542-1

Адрес: 344022 Ростов-на-Дону, переулок Нахичеванский, 29, ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, кафедра клинической иммунологии и аллергологии ФПК и ППС. Сизякина Людмила Петровна. Тел/факс: +7 (863) 263-44-41.

E-mail: msizjakina@mail.ru

Авторы:

Сизякина Л. П., д.м.н., профессор, заведующий кафедрой клинической иммунологии и аллергологии, директор НИИ клинической иммунологии ФГБОУ ВО РостГМУ Минздрава РФ, Ростов-на-Дону, Россия;

Харитонова М. В., аспирант кафедры клинической иммунологии и аллергологии ФГБОУ ВО РостГМУ Минздрава РФ, Ростов-на-Дону, Россия.

Ревматоидный артрит (РА) – тяжелое инвалидизирующее заболевание аутоиммунной природы. Поиск ключевых аспектов дисрегуляции иммунной системы, определяющих формирование аутоиммунной агрессии является актуальным для создания биомаркеров, контролирующего течение заболевания, определяющих прогноз, выбор тактики лечения и контроль ее эффективности. Достаточно дискуссионными успехами таргетной терапии, избирательно блокирующей ключевые цитокины либо иммунокомпетентные клетки, заставляют продолжать дальнейший поиск для разработки новых лекарственных препаратов [1, 2]. В частности, учитывая, что популяция В-лимфоцитов, продуцентов аутоантител,

представлена двумя субпопуляциями, представляло интерес изучить иммунофенотип В-лимфоцитов при формировании различных вариантов течения РА [3].

Цель настоящего исследования – выявление особенностей иммунофенотипов В-лимфоцитов у пациентов с серопозитивным и серонегативными вариантами РА суставной формы.

Критериями включения явилось наличие у пациента установленного диагноза серопозитивного или серонегативного варианта суставной формы РА на основании критериев ACR и Rheumatism – EULAR, II и III стадии активности, отсутствие острых инфекций, возраст старше 18 лет. Критериями исключения были наличие хронических инфекций, злокачественных новообразований и других сопутствующих заболеваний, в том числе аутоиммунных. Пациенты были разделены на 2 группы: серопозитивный вариант суставной формы РА (мужчин – 10, женщин – 41, средний возраст $48 \pm 18,0$ лет) и серонегативный вариант суставной формы РА (мужчин – 5, женщин – 36, средний возраст 50 ± 20 лет). Внутри групп проведено деление на подгруппы в зависимости от давности заболевания (до 5 лет и более) и степени активности (II ст. и III ст.). Изучение субпопуляционного состава В-лимфоцитов периферической крови прово-

дили с помощью проточной цитофлуориметрии по экспрессии мембранных и внутриклеточных антигенов, с учетом результатов на цитофлуориметре «FC500» (Beckman Coulter). Выделяли фенотипы В1 (CD19⁺CD5⁺), В2 (CD19⁺CD5⁻), наивные В2 (CD19⁺CD45RA⁺CD27⁻), В2-памяти (CD19⁺CD45RA⁻CD27⁺), оценивали маркеры презентации (CD19⁺HLADR⁺), ранней активации (CD19⁺CD23⁺, CD19⁺CD25), костимуляции (CD19⁺CD40⁺, CD19⁺CD86⁺), готовности к апоптозу (CD19⁺CD95⁺), экспрессии лиганда межклеточного взаимодействия (CD3⁺CD4⁺CD40L⁺). В качестве контрольной группы обследовано 20 доноров крови. Статистическая обработка проводилась с использованием пакета STATISTICA 6.2 и электронных таблиц Excel 2007.

При изучении В-лимфоцитов в активную фазу серопозитивного варианта РА было выявлено увеличение общего количества В-лимфоцитов (10,8±0,66%, в контроле 7,93±0,45%), а соотношение В1 и В2 субпопуляций в общем пуле В-клеток составило 7,3%:92,7% (в контроле 2,4:97,6). При манифестации заболевания до 5 лет соотношение В1: В2 составляет 4,4% и 95,6%, а при длительности более 5 лет – 9% и 91%, соответственно. Анализ субпопуляционного состава В-клеток в зависимости от активности серопозитивного РА показал, что при II ст. доля В1-клеток составила 4,8%, а В2 – 95,2%, при III ст. – 9,14% и 90,86%, соответственно. При серонегативном варианте суставной формы РА в период активации заболевания также увеличено общее количество В-лимфоцитов (11,8±0,71%) при соотношении 7,6% (В1) и 92,3% (В2). При стаже заболевания до 5 лет соотношение В1 В2 характеризовалось как 10,8%:89,2%, более 5 лет – 5,4%:94,6%; при II ст. активности – 10,4%:89,6%, при III ст. – 3,5%:96,4%, соответственно. Сопоставление данных о соотношении В1 и В2 между группами больных с серопозитивным и серонегативным вариантами существенных отличий не показало. В то же время, при длительности заболевания до 5 лет при серонегативном РА по сравнению с серопозитивным выявлено увеличение популяции В1-лимфоцитов, а при более высокой степени активности при серонегативном РА по сравнению с серопозитивным РА регистрируется снижение доли В1- и увеличение В2-лимфоцитов. Тем не менее, несмотря на изменения количества В1-клеток в сторону увеличения либо снижения, преобладающая субпопуляция при серопозитивном и серонегативном вариантах РА представлена В2-лимфоцитами.

Анализ свойств В2-лимфоцитов выявил, что при серопозитивном варианте увеличено количество CD27-наивных В2-клеток (8,34±0,57%, в контроле 5,65±0,46%) и экспрессия HLA-DR (9,52±0,62%, в контроле 7,39±0,41). Увеличение наивных В2-лимфоцитов определяется вне зависимости от длительности течения заболевания, но напрямую связана с выраженностью клинической манифестации. Так, при III ст. активности CD27⁻ В2-клеток статистически значимо больше (11,3±0,97%), чем при II степени (8,13±0,85%). При серонегативном РА количество циркулирующих наивных В2-клеток достоверно выше, чем в контрольной группе (8,90±0,74% и 5,65±0,46%), степень повышения не зависит ни от длительности, ни от активности процесса. В группе больных серонегативным РА отмечается усиление антигенпрезентирующей функции В-клеток, выражающееся усилением экспрессии HLADR по отношению к контрольным значениям (10,1±0,75% и 7,4±0,4%, соответственно), а также при длительности стажа заболевания до 5 лет (12,0±1,01%) и более (9,30±1,0%), при средней (9,11±1,45%) и высокой (11,4±1,49%) степенях активности. Сопоставительный анализ количества CD27 негативных и HLADR позитивных В-клеток между двумя формами РА в зависимости от длительности заболевания и степени активности процесса значимых различий не выявил.

Таким образом, увеличение общего количества циркулирующих В-лимфоцитов у пациентов с серопозитивным и серонегативным вариантами РА суставной формы определяется как за счет В1-, так и В2-лимфоцитов, с преобладанием доли В2-субпопуляции. При серопозитивном варианте количество В1-лимфоцитов увеличивается при более значительной длительности и степени активности заболевания, тогда как при серонегативном варианте РА эта тенденция имеет противоположную направленность. Выявленные изменения фенотипических свойств В2-клеток, связанные с усилением способности к распознаванию и презентации антигена в зависимости от длительности и степени тяжести могут быть использованы при мониторинге больных РА.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Насонов Е. Л., Александрова Е. Н., Новиков А. А. Аутоиммунные ревматические заболевания – проблемы иммунопатологии и персонализированной терапии // Вестн. РАМН. – 2015. – Т. 70,

- № 2.— С. 169—182. [Nasonov E. L., Alexandrova E. N., Novikov A. A. Autoimmune rheumatic diseases— problems of immunopathology and personalized therapy // Vestn. RAMS— 2015.— Т. 70, No. 2.— P. 169—182]
2. Bugatti S. B cell autoimmunity and bone damage in rheumatoid arthritis / S. Bugatti, L. Bogliolo, C. Montecucco, A. Manzo // Reumatismo.— 2016.— Vol. 68, N3.— P. 117—125.
 3. Сизякина Л. П., Харитоновна М. В. Характеристика В2-лимфоцитов у пациентов с серонегативным ревматоидным артритом суставной формы // Иммунология.— 2018.— Т. 39, № 2—3.— С. 134—137. [Sizyakina L. P., Kharitonova M. V. Characteristics of B2 lymphocytes in patients with seronegative rheumatoid arthritis of the articular form // Immunology.— 2018.— V. 39, No. 2—3.— p. 134—137].

THE ROLE OF B1 AND B2 LYMPHOCYTES IN THE FORMATION OF DIFFERENT VARIANTS OF RHEUMATOID ARTHRITIS

© 2019 L. P. Sizyakina*, M. V. Kharitonova

*E-mail: msiziakina@mail.ru

Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russia

Received: 14.02.2019. Accepted: 25.02.2019

The results of the phenotypic characteristics of B1 and B2 lymphocytes of patients with seropositive (51 people) and seronegative (41 people) variants of the course of articular form of rheumatoid arthritis are presented. An increase in the content of B1 lymphocytes in both seronegative and seropositive variants was shown. A distinctive feature of B2 lymphocytes in the seropositive compared with the seronegative option is to enhance the activation processes and decrease the intensity of apoptosis with the progression of the autoimmune process.

Key words: B1 and B2 lymphocytes, B-cell immunophenotype, rheumatoid arthritis, articular form

Authors:

Sizyakina L. P., ✉ MD, PhD, Head of the Department of Clinical Immunology and Allergology, Director of the Institute of Clinical Immunology Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russia. **E-mail:** msiziakina@mail.ru;

Kharitonova M. V., Post-Graduate Student of the Department of Clinical Immunology and Allergology. Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russia.

ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ КОНЦЕНТРАЦИЙ ИНТЕРФЕРОНА-ГАММА (ИНФ- γ) НА КЛЕТКИ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ *IN VITRO*

© 2019 г. А. О. Ситковская*, А. Б. Сагакянц, С. Ю. Филиппова, И. В. Межевова,
Е. С. Бондаренко, К. Г. Стаценко, М. М. Попова

*E-mail: grankina.anastasia@mail.ru

ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт»
Минздрава России, Ростов-на-Дону, Россия

Поступила: 15.03.2019. Принята: 29.03.2019

Работа была направлена на определение возможности активации лимфоцитов и натуральных киллеров при добавлении различных концентраций ИНФ- γ *in vitro*. Результаты исследования показали, что интерферон-гамма способствует созреванию эффекторных клеток Т-звена иммунной системы.

Ключевые слова: ИНФ- γ , лимфоциты, активация клеток иммунной системы

DOI: 10.31857/S102872210006541-0

Адрес: 344037, Ростов-на-Дону, ул. 14-линия, 63, ФГБУ «РНИОИ» Минздрава России, лаборатория клеточных технологий. Ситковская Анастасия Олеговна.

Тел. 8 919 879 16 61 (моб.).

E-mail: grankina.anastasia@mail.ru

Авторы:

Ситковская А. О., врио зав. лаборатории клеточных технологий ФГБУ «РНИОИ» Минздрава России, Ростов-на-Дону, Россия;

Сагакянц А. Б., рук. лаборатории иммунофенотипирования опухолей ФГБУ «РНИОИ» Минздрава России, Ростов-на-Дону, Россия;

Филиппова С. Ю., н.с. лаборатории клеточных технологий ФГБУ «РНИОИ» Минздрава России, Ростов-на-Дону, Россия;

Межевова И. В., м.н.с. лаборатории клеточных технологий ФГБУ «РНИОИ» Минздрава России, Ростов-на-Дону, Россия;

Бондаренко Е. С., м.н.с. лаборатории иммунофенотипирования опухолей ФГБУ «РНИОИ» Минздрава России, Ростов-на-Дону, Россия;

Стаценко К. Г., студент ФГБУ «РНИОИ» Минздрава России, Ростов-на-Дону, Россия;

Попова М. М., студент ФГБУ «РНИОИ» Минздрава России, Ростов-на-Дону, Россия.

Несмотря на успехи хирургии в онкологии, средняя выживаемость больных низкодифференцированными глиомами за последние десятилетия увеличилась лишь на 2–3 месяца [1]. В виду этого возникает необходимость поиска системных методов лечения онкологических заболеваний, одним из которых является иммунотерапия [2]. Особое место занимает адоптивная

иммунотерапия, предусматривающая введение больному стимулированных цитокинами *ex vivo* аутологичных или аллогенных иммунокомпетентных клеток (Т-, В-, НК-клетки) [3].

Целью исследования являлось определить возможность активации лимфоцитов (Лф) и натуральных киллеров (НК) при добавлении различных концентраций интерферона-гамма *in vitro*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В нашей работе в качестве ИНФ- γ использовался препарат Ингарон® (100000 МЕ). Для получения исследуемого материала проводился забор периферической крови из локтевой вены у здоровых доноров в объеме 16 мл в пробирки (BD) с последующим выделением мононуклеарных клеток периферической крови (МНК) по стандартной методике. После выделения МНК проводили осаждение и адгезию полученной клеточной суспензии в течение 2 часов в питательной среде RPMI 1640 (Биолот) в условиях 5% CO₂ при t=37 °C. Далее не прикрепившиеся к культуральному пластику клетки (Лф, НК) подсчитывали и пассировали в 6-луночные планшеты по 5×10⁵ клеток в каждой лунке с разной концентрацией ИНФ- γ (5МЕ, 50МЕ, 500МЕ, 5000МЕ, 50000МЕ) в среде RPMI 1640

(Биолот) с добавлением 10% телячьей эмбриональной сыворотки. Ежедневно проводился подсчет клеток в каждой лунке. На 1, 3, 4 и 8 дни определяли фенотип клеточный на проточном цитофлюориметре FACSCanto II с использованием панели маркёров CD3/CD19/CD16⁺56/CD4/CD8 /HLADR/CD38/CD45 (BD).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Наибольшая пролиферативная активность клеток во время культурального этапа исследования наблюдалась при минимальной дозе ИНФ-γ (5МЕ). Время экспозиции начала и завершения пролиферации соответствовало показателям контрольной лунки (0МЕ). Однако на 3 сутки в опытном образце (5МЕ ИНФ-γ) существенно увеличилось количество клеточного материала и превысило значения контрольного образца в 1,4 раза. В опытных образцах с дозами ИНФ-γ 50МЕ, 5000МЕ и 50000МЕ наблюдалась схожая «скачкообразная» пролиферация клеток: на 2 и 4 дни экспозиции количество клеток увеличивалось, при том, что на 3 день во всех случаях данный показатель снижался, что может быть связано с паракринным эффектом клеток, так как известно, что лимфоидные клетки являются продуцентами ИНФ-γ. При воздействии на исследуемые клетки дозой ИНФ-γ 500МЕ значимых изменений не наблюдалось. Результаты проведенного иммунофенотипирования контрольных и опытных образцов показали увеличение экспрессии маркеров главного комплекса гистосовместимости 2 класса (МНС II класса) – HLA-DR на Т-лимфоцитах. Так, практически при всех используемых дозах ИНФ-γ наблюдалось постепенное возрастание значений данного маркера на клетках CD3⁺, наибольшая экспрессия определялась при воздействии на исследуемую суспензию клеток дозой ИНФ-γ 5МЕ. В то же время динамика изменения МНС II класса CD4/HLA-DR не повторяла общей картины. Показатели варьировали, имелась тенденция к снижению коэкспрессии CD4/HLA-DR, однако в последний день они принимали исходные значения, а при концентрации ИНФ-γ 50000МЕ увеличивались в 2,5 раза по сравнению с исходными. В контрольном образце количество CD8/HLA-DR практически не менялось и возрастало на 8 день в 1,8 раз. При этом во всех опытных образцах наблюдалось увеличение данного показателя, ярко выраженное при концентрации ИНФ-γ 5МЕ и незначительно при 50000МЕ.

ОБСУЖДЕНИЕ

Известна способность ИНФ-γ повышать экспрессию антигенов главного комплекса гистосовместимости (ГКГС) как 1-го, так и 2-го классов на разных клетках, причем индуцирует экспрессию этих молекул даже на тех клетках, которые не экспрессируют их конститутивно. Тем самым повышается эффективность презентации антигенов и способность их распознавания Т-лимфоцитами, что способствует активации клеточных реакций адаптивного иммунитета. В проведенной работе нами отмечена наибольшая эффективность продуктивности концентрации ИНФ-γ 5МЕ, так как в этом случае наблюдалась наибольшая пролиферативная активность клеток, что отмечается на кривой роста. Кроме того, при внесении ИНФ-γ данной концентрации выявлены самые высокие значения экспрессии HLA-DR на Т-лимфоцитах. Мы предполагаем, что функция Ингарона в условиях нашего эксперимента состояла в запуске физиологического созревания эффекторных Т-клеток иммунной системы, что является основой для эффективной работы системы адаптивного иммунитета. Вероятно, в этих условиях следует ожидать и изменение активности клеток врожденного иммунитета, но это требует проведения дальнейших исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. *Gama H. P., Rocha A. J., Silva C. J., Mendes M. F., Veiga I. C., Lancelotti C. I., Andrade V. P., Tiberio C. P.* Meningioma growth during interferon beta-1A treatment for multiple sclerosis. *Arq Neuropsiquiatr.* 2008, 66(2B), 402–404.
2. *Мухачева М. В., Бейн Б. Н.* Роль интерферонов в противоопухолевом иммунитете у больных с церебральными опухолями. *Фундаментальные исследования.* 2015, 1(7), 1486–1490. [*Mukhacheva M. V., Bein B. N.* The role of interferon in antitumor immunity in patients with cerebral tumors. *Basic research.* 2015, 1(7), 1486–1490].
3. *Златник Е. Ю., Ситковская А. О., Непомнящая Е. М., Джандигова Ф. Р., Ващенко Л. Н.* Достижения и перспективы клеточных технологий на основе активированных лимфоцитов в лечении злокачественных опухолей. *Казанский медицинский журнал.* 2018, 5, 792–801. [*Zlatnik E. Yu., Sitkovskaya A. O., Nepomnyashchaya E. M., Dzhandigova F. R., and Vashchenko L. N.* Achievements and prospects of cellular technologies based on activated lymphocytes in the treatment of malignant tumors. *Kazan Medical Journal.* 2018, 5, 792–801].

**INFLUENCE OF DIFFERENT INTERFERON-GAMMA (IFN- γ)
CONCENTRATIONS ON CELLS OF THE IMMUNE SYSTEM *IN VITRO***

© 2019 **A. O. Sitkovskaya***, **A. B. Sagakyants**, **S. Yu. Filippova**, **I. V. Mezhevova**,
E. S. Bondarenko, **K. G. Statsenko**, **M. M. Popova**

*E-mail: grankina.anastasia@mail.ru

Rostov Research Institute of Oncology, Rostov-on-Don, Russia

Received: 15.03.2019. **Accepted:** 29.03.2019

The work was aimed at determining the possibility of activation of lymphocytes and natural killer cells with the addition of various concentrations of IFN- γ *in vitro*. The results showed that IFN- γ promotes maturation of T effector cell-mediated immunity system.

Key words: IFN- γ , lymphocytes, natural killer cells, activation of immune system cells

Authors:

Sitkovskaya A. O., ✉ Head of the Cell Technology Laboratory of the Rostov research institute of oncology, Ministry of Health of Russia, Rostov-on-Don, Russia. **E-mail:** grankina.anastasia@mail.ru;

Sagakyants A. B., Ph.D., Head of the Laboratory of tumor immunophenotyping of the Rostov research institute of oncology, Rostov-on-Don, Russia;

Filippova S. Yu., Researcher, Laboratory of Cell Technologies of the laboratory of tumor immunophenotyping of the Rostov research institute of oncology, Rostov-on-Don, Russia;

Mezhevova I. V., Junior researcher of the Laboratory of tumor immunophenotyping of the Rostov research institute of oncology, Rostov-on-Don, Russia;

Bondarenko E. S., Junior researcher of the Laboratory of tumor immunophenotyping of the Rostov research institute of oncology, Rostov-on-Don, Russia;

Statsenko K. G., student of the Rostov research institute of oncology, Rostov-on-Don, Russia;

Popova M. M., student of the Rostov research institute of oncology, Rostov-on-Don, Russia.

ОНКОЛИТИЧЕСКИЙ РЕОВИРУС Р-92: ЭФФЕКТ ПРИ ГЕНЕРАЦИИ ЗРЕЛЫХ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК (ИССЛЕДОВАНИЕ *IN VITRO*)

© 2019 г. А. О. Ситковская^{1*}, И. В. Межевова¹, Е. С. Бондаренко¹, С. А. Колпаков², Е. П. Колпакова², А. А. Кармиргодиев¹, П. С. Панченко¹

*E-mail: grankina.anastasia@mail.ru

¹ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России, Ростов-на-Дону, Россия;

²ФБУН «Ростовский научно-исследовательский институт микробиологии и паразитологии» Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону, Россия

Поступила: 14.03.2019. Принята: 26.03.2019

Проводилось исследование влияния реовируса (штамм Р-92) на созревание дендритных клеток (ДК), полученных из МНК периферической крови здоровых доноров, в т.ч., при нагрузке опухолевым антигеном. Результаты показали, что внесение реовируса штамма Р-92 на этапе нагрузки антигеном незрелых ДК стимулирует экспрессию ключевых маркеров, характеризующих их созревание, костимулирующую и презентующую активность.

Ключевые слова: онколитические вирусы, реовирус Р-92, дендритно-клеточные вакцины

DOI: 10.31857/S102872210006540-9

Адрес: 344037, Ростов-на-Дону, ул. 14-линия, 63, ФГБУ «РНИОИ» Минздрава России, лаборатория клеточных технологий, Ситковская Анастасия Олеговна.

Тел.: 8 919 879 16 61 (моб.).

E-mail: grankina.anastasia@mail.ru

Авторы:

Ситковская А. О., врио зав. лаб. клеточных технологий ФГБУ «РНИОИ» Минздрава России, Ростов-на-Дону, Россия;

Межевова И. В., м.н.с. лаб. клеточных технологий ФГБУ «РНИОИ» Минздрава России, Ростов-на-Дону, Россия;

Бондаренко Е. С., м.н.с. лаб. иммунофенотипирования опухолей ФГБУ «РНИОИ» Минздрава России, Ростов-на-Дону, Россия;

Колпаков С. А., к.м.н., с.н.с. лаб. вирусологии, микробиологии и молекулярно-биологических методов исследования ФБУН «РНИИМП» Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону, Россия;

Колпакова Е. П., н.с. лаб. вирусологии, микробиологии и молекулярно-биологических методов исследования ФБУН «РНИИМП» Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону, Россия;

Кармиргодиев А. А., студент ФГБУ «РНИОИ» Минздрава России, Ростов-на-Дону, Россия;

Панченко П. С., студент ФГБУ «РНИОИ» Минздрава России, Ростов-на-Дону, Россия.

Вопрос об активации иммунной системы больных раком с помощью биотерапии является актуальным. Один из таких подходов – введение пациентам дендритно-клеточной вакцины

(ДКВ), которая, к сожалению, не всегда показывает эффективные результаты. Перспективным методом индукции противоопухолевого действия является использование онколитических вирусов (ОВ), целенаправленно за счет ряда механизмов воздействующих на опухолевые клетки [1], что приводит к высвобождению из них различных антигенов. Вместе с тем, ОВ сами являются экзогенными антигенами. Мы придерживались гипотезы, что стимуляция дендритных клеток (ДК) под влиянием подобных антигенов может способствовать усилению генерации антиген-специфических лимфоцитов против опухолевых клеток [2].

Целью нашей работы являлось изучение возможности повышения эффективности созревания дендритных клеток, в т.ч., при их нагрузке опухолевым антигеном *in vitro* с помощью добавления реовируса штамма Р-92.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве вирусного агента использовался реовирус штамм Р-92 (3 серотипа), охарактеризованный ранее [3]. Генерацию ДК проводили из моноцитов, полученных из периферической

крови здоровых доноров с использованием ИЛ-4 (20 нг/мл), GM-CSF (72 нг/мл). На 7-й день инкубации проводили фенотипирование на проточном цитофлуориметре (FACSCantoII, BD). Для определения незрелых ДК оценивали экспрессию маркера CD1a. Далее клетки в равной пропорции пересаживали на 3 культуральных флакона в кондиционированной среде, добавляли также ИЛ-4, GM-CSF и TNF- α (20 нг/мл) вместе с индивидуальной антигенной нагрузкой для каждого флакона: А) лизат культуры клеток HeLa; Б) реовирус + лизат культуры клеток HeLa, полученный, как описано ранее [4]; В) реовирус, культивируемый в стандартной культуре клеток СПЭВ. Через 48 часов образцы фенотипировали с целью определения экспрессии антигенов CD80/CD83/CD86/HLA-DR/CD1a/CD45 (BD), позволяющих охарактеризовать созревание ДК.

РЕЗУЛЬТАТЫ

При достижении 25% экспрессии CD1a на культивируемых ДК их нагружали антигенами. Результаты фенотипирования ДК после антигенной нагрузки показали, что экспрессия CD80 при добавлении реовируса в образцах Б и В была выше в 1,3 и 1,2 раза соответственно, чем в пробе А. Наибольшее количество CD86 наблюдалось в образце Б (95,3%), а CD83 — при нагрузке незрелых ДК только реовирусом (72,9%). Маркер HLA-DR экспрессировался на 72,1% клеток в образце А, 90,4% — в образце Б и 92,3% в образце В. Максимальная коэкспрессия CD80/CD86 наблюдалась при нагрузке ДК антигенами HeLa и реовирусом Р-92.

ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные результаты показали, что добавление реовируса Р-92 способствует усилению созревания ДК, о чем свидетельствует повышение экспрессии ключевого маркера зрелых ДК (CD83), маркеров (CD80/CD86), обеспечивающих костимулирующие сигналы, необходимые для активации и выживания Т-клеток, а также рецептора клеточной поверхности МНС класса II (HLA-DR), ответственного за презентацию чужеродных антигенов Т-клеткам. Таким образом, реовирус Р-92 можно рассматривать

как адъювант при генерации ДК, нагруженных опухолевым антигеном, из моноцитов периферической крови здоровых доноров.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Ситковская А. О., Златник Е. Ю., Новикова И. А., Кит О. И. Вирус болезни Ньюкасла и иммунитет — эффективный альянс в борьбе против рака (обзор литературы). Сибирский онкологический журнал. 2018, 17(6), 105–113. [Sitkovskaya A. O., Zlatnik E. Yu., Novikova I. A., Kit O. I. Newcastle disease virus and immunity — an effective alliance against cancer (literature review). Siberian Oncology Journal. 2018, 17 (6), 105–113].
2. Златник Е. Ю., Ситковская А. О., Непомнящая Е. М., Джандигова Ф. Р., Ващенко Л. Н. Достижения и перспективы клеточных технологий на основе активированных лимфоцитов в лечении злокачественных опухолей. Казанский медицинский журнал. 2018, 5, 792–801. [Zlatnik E. Yu., Sitkovskaya A. O., Nepomnyashchaya E. M., Dzhandigova F. R., and Vashchenko L. N. Achievements and prospects of cellular technologies based on activated lymphocytes in the treatment of malignant tumors. Kazan Medical Journal. 2018, 5, 792–801].
3. Колпаков С. А., Колпакова Е. П. Неклассифицированные вирусы человека семейства *Reoviridae*. В сборнике: Актуальные вопросы диагностики и профилактики инфекционных и паразитарных заболеваний на юге России. Материалы межрегиональной научно-практической конференции с международным участием. 2016, 243–247. [Kolpakov S. A., Kolpakova E. P. Unclassified human viruses of the *Reoviridae* family. In the collection: Current Issues of Diagnostics and Prevention of Infectious and Parasitic Diseases in the South of Russia. Materials of the interregional scientific-practical conference with international participation. 2016, 243–247].
4. Ситковская А. О., Златник Е. Ю., Новикова И. А., Колпаков С. А., Колпакова Е. П., Потемкин Д. С., Васильченко Н. Г., Триандафилиди Е. И., Быкадорова О. В. Исследование возможности онколитических эффектов *in vitro* вирусов из семейств *Reoviridae* и *Paramyxoviridae*. Известия ВУЗов. Северо-Кавказский регион. Естественные науки. 2018, 4(200), 124–130. [Sitkovskaya A. O., Zlatnik E. Yu., Novikova I. A., Kolpakov S. A., Kolpakova E. P., Potemkin D. S., Vasilchenko N. G., Triandafilidi E. I., Bykadorova O. V. Investigation of the possibility of oncolytic effects of *in vitro* viruses from the *Reoviridae* and *Paramyxoviridae* families. University news. North Caucasus region. Natural Sciences. 2018, 4 (200), 124–130].

ONCOLYTIC REOVIRUS R-92: EFFECT IN THE GENERATION OF MATURE DENDRITIC CELLS (RESEARCH *IN VITRO*)

© 2019 A. O. Sitkovskaya^{1*}, I. V. Mezhevova¹, E. S. Bondarenko¹, S. A. Kolpakov², E. P. Kolpakova², A. A. Karmirgodiev¹, P. S. Panchenko¹

*E-mail: grankina.anastasia@mail.ru

¹Rostov Research Institute of Oncology, Rostov-on-Don, Russia;

²FBUN «Rostov Research Institute of Microbiology and Parasitology» of Rospotrebnadzor, Rostov-on-Don, Russia

Received: 14.03.2019. Accepted: 26.03.2019

Study was conducted of the effect of reovirus strain R-92 on the maturation of dendritic cells (DC). Work was carried out on PBMCs from the peripheral blood of healthy donors. The results showed that the presence of reovirus strain P-92 at the stage of differentiation of immature DC into a mature state leads to increased expression of key markers of mature DC.

Key words: oncolytic viruses, reovirus R-92, dendritic cell vaccines

Authors:

Sitkovskaya A. O., ✉ Head of Lab. of the Cell Technology, Rostov research institute of oncology, Rostov-on-Don, Russia.

E-mail: grankina.anastasia@mail.ru;

Mezhevova I. V., Junior researcher of the Lab. of tumor immunophenotyping, Rostov research institute of oncology, Rostov-on-Don, Russia;

Bondarenko E. S., Junior researcher of the Lab. of tumor immunophenotyping, Rostov research institute of oncology, Rostov-on-Don, Russia;

Kolpakov S. A., Ph.D., Senior Researcher, Lab. of Virology, Microbiology and Molecular Biological Research Methods, Rostov Research Institute of Microbiology and Parasitology of Rospotrebnadzor, Rostov-on-Don, Russia;

Kolpakova E. P., Researcher, Lab. of Virology, Microbiology and Molecular Biological Research Methods of the Rostov Research Institute of Microbiology and Parasitology of Rospotrebnadzor, Rostov-on-Don, Russia;

Karmirgodiev A. A., student of the Rostov research institute of oncology, Rostov-on-Don, Russia;

Panchenko P. S., student of the Rostov research institute of oncology, Rostov-on-Don, Russia.

СОСТОЯНИЕ JAK-STAT СИСТЕМЫ ПРИ ГНОЙНО-ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ МЯГКИХ ТКАНЕЙ

© 2019 г. И. А. Снимщикова, Н. А. Кабина, М. О. Плотникова*,
И. А. Афонина, А. Д. Честнихина

*E-mail: revyakina_masha@mail.ru

ФГБОУ ВО «Орловский государственный университет имени И. С. Тургенева», Орёл, Россия

Поступила: 12.03.2019. Принята: 25.03.2019

Охарактеризована роль нарушений JAK-STAT-сигнальной трансдукции и SOCS-регуляции в цитокин-зависимой активации при гнойно-воспалительных заболеваниях мягких тканей.

Ключевые слова: раневая инфекция, сигнальные JAK-STAT-пути, цитокины, супрессоры цитокинового сигнала (SOCS)

DOI: 10.31857/S102872210006539-7

Адрес: 302000, Орёл, ул. Комсомольская, 95 ФГБОУ ВО «Орловский государственный университет имени И. С. Тургенева», кафедра иммунологии и специализированных клинических дисциплин, Плотникова Мария Олеговна.
Тел.: 8 (4862) 432186.

E-mail: revyakina_masha@mail.ru

Авторы:

Снимщикова И. А., д.м.н., профессор, директор медицинского института ФГБОУ ВО «Орловский государственный университет имени И. С. Тургенева», Орёл, Россия;

Кабина Н. А., старший преподаватель кафедры фармакологии, клинической фармакологии и фармации ФГБОУ ВО «Орловский государственный университет имени И. С. Тургенева», Орёл, Россия;

Плотникова М. О., старший преподаватель кафедры иммунологии и специализированных клинических дисциплин ФГБОУ ВО «Орловский государственный университет имени И. С. Тургенева», Орёл, Россия;

Афонина И. А., к.м.н., доцент кафедры иммунологии и специализированных клинических дисциплин ФГБОУ ВО «Орловский государственный университет имени И. С. Тургенева», Орёл, Россия;

Честнихина А. Д., старший преподаватель кафедры общественного здоровья, здравоохранения и гигиены ФГБОУ ВО «Орловский государственный университет имени И. С. Тургенева», Орёл, Россия.

Гнойно-воспалительные заболевания мягких тканей до настоящего времени остаются одной из актуальных проблем современной медицины, что обусловлено их распространённостью, тенденцией к хроническому течению, недостаточной эффективностью традиционных методов лечения. Изучению роли нарушений иммунного ответа при гнойных ранах посвящены многочис-

ленные исследования, однако многие особенности дисрегуляции компонентов врождённого и адаптивного иммунитета при раневой инфекции остаются дискуссионными и нуждаются в уточнении. В последние годы показано, что инфекционно-воспалительные процессы зачастую связаны с патологией рецепторных мембранных и/или ферментных внутриклеточных систем передачи цитокин-опосредованного сигнала. Взаимодействие цитокинов с рецепторами на поверхности клеток приводит к запуску сигнального JAK-STAT-пути, основными компонентами которого являются тирозинкиназы JAK, TYK и транскрипционные факторы STAT. При этом набор янус-киназ и STAT-белков для каждого цитокина достаточно специфичен, а супрессоры цитокинового сигнала (SOCS) подавляют процесс его передачи, как нарушая активацию янус-киназ, так и разрушая образованные в процессе каскада цитокин-опосредованных реакций белки [1]. Тем не менее, механизмы внутриклеточной передачи сигнала цитокин-зависимой активации клеток посредством факторов JAK-STAT-сигналинга и особенности их супрессии при ранах и раневой инфекции не исследованы. В связи с этим изучение молекулярных механизмов нарушений иммунного ответа при гнойно-воспалительных заболеваниях, является перспективными не только для понимания патогенеза заболеваний, но и поиска новых подходов к диагностике и терапии.

В последние годы появились новые данные о том, что супрессор семейства белков цитокинов (SOCS) является одним из центральных регуляторов микробной патоген-индуцированной сигнализации цитокинов, главным образом за счет ингибирования активации сигнальных каскадов JAK/STAT [2]. Кроме того, обсуждаются последствия участия белков SOCS в различных бактериальных процессах, а также возможности, обусловленные этими белками для их будущего целевого использования в антимикробной терапии. Вместе с тем роль этих белков в регуляции уровня индуцированной микробным патогеном сигнальной активации цитокинов с использованием каскадов JAK/STAT и опосредованные этим исходы различных бактериальных инфекций мягких тканей не исследованы [3].

Целью работы явилось изучение роли нарушений JAK-STAT-сигнальной трансдукции и SOCS-регуляции в цитокин-зависимой активации при гнойно-воспалительных заболеваниях мягких тканей.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Нами были обследованы пациенты с гнойными ранами и раневой инфекцией. В исследование вошли 145 больных (средний возраст $42,7 \pm 3,5$ лет): 85 — с ранами после вскрытия абсцессов и флегмон мягких тканей; 30 — с посттравматическими ранами; 30 — с флегмонозно-некротической формой рожи. Для получения раневого экссудата (РЭ) использовали стерильные марлевые тампоны, которые помещали в рану с экспозицией на 20–30 секунд. После аппликации пропитанный тампон вносили в пробирку с 0,2 мл 0,9% раствора натрия хлорида на 30 минут с последующим его удалением после центрифугирования в течение 5 минут при 1500 об/мин.

С учетом современных данных о важной роли дефектов сигнальных путей в патогенезе иммуноопосредованной патологии методом ИФА были исследованы уровни в периферической крови и раневом экссудате SOCS1,3,6 и STAT1, STAT3, STAT6, а также цитокины ИЛ-10, ИЛ-1Ra, TФP-β1, ИЛ-1β, ИЛ-8, ИЛ-6, ФНО-α.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенные нами исследования показали, что у 75% больных с типичным течением раневого процесса наблюдается увеличение синтеза

воспалительных цитокинов, коррелирующее с благоприятным течением раневого процесса. Хроническая форма раневой инфекции, как правило, сопровождалась гиперпродукцией воспалительных и противовоспалительных (ИЛ-10, ИЛ-1Ra, TФP-β1) цитокинов, а снижение продукции ИЛ-1β, ИЛ-8, ИЛ-6, ФНО-α на фоне затяжного течения патологического процесса в мягких тканях регистрировалось у 12% больных. Исследования концентраций воспалительных цитокинов в РЭ в острую фазу раневого процесса выявили повышение их уровня по сравнению со стандартными значениями для биологических жидкостей в 87% случаев. При этом более высокие концентрации в раневой жидкости отмечены для ИЛ-1β и ИЛ-8 при хроническом течении раневой инфекции, что у 66% данных пациентов сочеталось с повышенным уровнем в сыворотке крови ИЛ-1β, ИЛ-6 и ФНО-α, а у 15% — ИЛ-1β. Концентрации ИЛ-10 и TФP-β1 в раневой жидкости, полученной из длительно незаживающих ран, значительно превышали (на 20–45%) уровни данных противовоспалительных цитокинов в заживающих ранах.

Большой интерес представляют полученные нами данные о дисбалансе продукции факторов транскрипции STAT1,3,6 и супрессоров цитокинового сигнала SOCS1,3,6 при гнойных ранах, определяющих цитокин-зависимую регуляцию клеток. Так, у всех пациентов было выявлено повышение уровня экспрессии транскрипционного фактора STAT1 и 6. При этом у 28% обследованных лиц данные показатели имели диапазон значений от 1500 до 2500 пкг/мл и выше. Кроме того, важное значение, на наш взгляд, в оценке тяжести иммунной дисфункции у больных с гнойными ранами имел разработанный нами интегральный коэффициент STAT6/STAT1, повышенные значения которого коррелировали с тяжестью патологического процесса в мягких тканях. Для STAT3 были установлены разнонаправленные изменения уровней в сыворотке крови. При этом у 76% больных его значения составили $237,4 \pm 0,03$ пкг/мл.

Учитывая, что специфичность различных SOCS определяется цитокинами, а не конкретными STAT, что позволяет SOCS регулировать антагонистические взаимоотношения между цитокинами, заслуживают внимание данные о дисбалансе продукции SOCS1 и повышенной продукции SOCS3 у исследуемой группы пациентов, что может иметь решающее значение не

только в иммунной поляризации T α 2, характеризующихся повышенной экспрессией SOCS3, но и в развитии локальной и системной цитокин-зависимой иммуносупрессии [1]. Это подтверждается выше приведенными данными о значительном повышении концентрации ИЛ-10 в раневой жидкости, полученной из длительно незаживающих ран [4]. Следует отметить, что у данной группы пациентов регистрировались низкие показатели ИФН γ , что согласуется с данными литературы о возможности ИЛ-10 подавлять ИФН сигнал, иницируя синтез SOCS3.

Полученные данные, характеризующие STAT-сигнализацию при гнойных ранах, свидетельствуют о множественности и гетерогенности регуляторных нарушений как на рецепторном уровне, так и на уровне транскрипционных факторов и их регуляторов.

Результаты проведенных исследований перспективны и важны с практической точки зрения, так как лучшее понимание молекулярных механизмов контроля иммунной реакции и воспаления является ключом к разработке эффективных целевых терапевтических препаратов и вакцин.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. *Aboulhoda B. E.* Age-related remodeling of the JAK/STAT/SOCS signaling pathway and associated myocardial changes: From histological to molecular level/ *Ann Anat.* 2017 Nov; 214:21–30.
2. *Almeida-Oliveira A. R., Aquino-Junior J., Abbasi A., Santos-Dias A., Oliveira-Junior M. C., Alberca-Custodio R. W., Rigonato-Oliveira N. C., Salles-Dias L. P., Damaceno-Rodrigues N. R., Caldini E. G., Arantes-Costa F. M., Ligeiro-Oliveira A. P., Belvisi M. G., Vieira R. P.* Effects of aerobic exercise on molecular aspects of asthma: involvement of SOCS-JAK-STAT/ *Exerc Immunol Rev.* 2019; 25:50–62.
3. *Feng Y., Sanders A. J., Morgan L. D., Owen S. Ruge F., Harding K. G., Jiang W. G.* Expression of the SOCS family in human chronic wound tissues: Potential implications for SOCS in chronic wound healing / *Int J Mol Med.* 2016 Nov; 38 (5)2016.
4. *Шохина М. Д., Снимщикова И. А., Халилов М. А., Честныхина А. Д., Афонина И. А., Кабина Н. А.* Динамика изменений концентрации метаболитов оксида азота при раневой инфекции / *Медицинская иммунология.* 2017. Т. 19. № 5. С. 336. [*Shokhina M. D., Snimshikova I. A., Khalilov M. A., Chestnykhina A. D., Afonina I. A., Kabina N. A.* Dynamics of changes in the concentration of metabolites of nitric oxide in wound infections / *Medical immunology.* 2017. V. 19. No. 5. S. 336].

CONDITION OF JAK-STAT SYSTEM IN PURULENT-INFLAMMATORY DISEASES OF SOFT TISSUES

© 2019 I. A. Snimshikova, N. A. Khabina, M. O. Plotnikova*, I. A. Afonina, A. D. Chestnihina

*E-mail: revyakina_masha@mail.ru

Oryol State University named after I. S. Turgenyev, Orel, Russia

Received: 12.03.2019. Accepted: 25.03.2019

Characterization of impaired JAK-STAT-signal transduction and SOCS regulation in cytokine-dependent activation in purulent-inflammatory diseases of soft tissues.

Key words: wound infection, signaling JAK-STAT pathways, cytokines, cytokine signal suppressors (SOCS)

Authors:

Snimshikova I. A., Professor, doctor of medicine, head of Department of Immunology and specialized clinical disciplines “Oryol State University named after I. S. Turgenyev”, Orel, Russia;

Kabina N. A., Associate Professor at the Department of pharmacology, clinical pharmacology and pharmacy, “Oryol State University named after I. S. Turgenyev”, Orel, Russia;

Plotnikova M. O., Associate Professor at the Department of Immunology and specialized clinical disciplines “Oryol State University named after I. S. Turgenyev”, Orel, Russia. E-mail: revyakina_masha@mail.ru;

Afonina I. A., Associate Professor at the Department of Immunology and specialized clinical disciplines “Oryol State University named after I. S. Turgenyev”, Orel, Russia;

Chestnykhina A. D., Associate Professor at the Department of Public health, health and hygiene, “Oryol State University named after I. S. Turgenyev”, Orel, Russia.

ПРОЯВЛЕНИЕ РЕГЕНЕРАТОРНОГО ПОТЕНЦИАЛА ВНЕОСТРОВКОВЫХ ИНСУЛИН-СИНТЕЗИРУЮЩИХ КЛЕТОК ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ДИАБЕТА 2 ТИПА И ПРИ ВВЕДЕНИИ АМИНОФТАЛГИДРАЗИДА

© 2019 г. К. В. Соколова^{1,2*}, В. В. Емельянов², И. Ф. Гетте^{1,2},
М. Т. Абидов³

*E-mail: kssokolova@bk.ru

¹ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии УрО РАН», Екатеринбург, Россия;

²ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России
Б. Н. Ельцина», Екатеринбург, Россия;

³Институт иммунопатологии, Любляна, Словения

Поступила: 12.03.2019. Принята: 26.03.2019

Восстановление количества, размеров клеток и их функциональной активности отражает способность ткани к регенерации. Аминофталгидразид (АФГ), влияющий на сдвиг фенотипа макрофагов М1→М2, увеличивает количество и размеры инсулин-синтезирующих клеток, расположенных в протоках поджелудочной железы. Кроме того, АФГ увеличивает оптическую плотность инсулина в бета-клетках панкреатических островков и инсулин-синтезирующих клетках, расположенных в ацинарной части и в протоках железы.

Ключевые слова: внеостровковые инсулин-синтезирующие клетки, макрофаги, аминофталгидразид, диабет 2 типа

DOI: 10.31857/S102872210006538-6

Адрес: 620049, Екатеринбург, ул. Первомайская, 106, ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии УрО РАН», лаборатория морфологии и биохимии. Соколова Ксения Викторовна. Тел.: +7 906 800 72 58 (моб.).

E-mail: kssokolova@bk.ru

Авторы:

Соколова К. В., м.н.с. лаборатории морфологии и биохимии ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии УрО РАН», Екатеринбург, Россия; аспирант кафедры медицинской биохимии и биофизики Института естественных наук и математики ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б. Н. Ельцина», Екатеринбург, Россия;

Емельянов В. В., к.м.н., доцент кафедры иммунохимии Химико-технологического института, доцент кафедры медицинской биохимии и биофизики Института естественных наук и математики ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б. Н. Ельцина», Екатеринбург, Россия;

Гетте И. Ф., к.б.н., с.н.с. лаборатории морфологии и биохимии ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии УрО РАН», Екатеринбург, Россия; с.н.с. кафедры иммунохимии Химико-технологического института ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б. Н. Ельцина», Екатеринбург, Россия;

Абидов М. Т., д.м.н., Институт иммунопатологии, Любляна, Словения.

АКТУАЛЬНОСТЬ

Распространённость сахарного диабета (СД), особенно диабета 2 типа, растёт по всему миру. При СД страдают β -клетки, производящие инсулин, что приводит к гипергликемии и развитию осложнений, поэтому механизмы возможного образования β -клеток как *in vitro*, так и *in vivo*, представляют существенный интерес. Механизм регенерации островков изучен недостаточно. Сообщается о неогенезе островков, т.е. образовании их из стволовых клеток, расположенных в протоках [1]. Ещё одним способом восстановления функции повреждённой ткани поджелудочной железы является ациноинсулярная трансформация: введение глюкозы приводит к появлению агрегатов и одиночно расположенных в составе экзокринной паренхимы инсулин-продуцирующих клеток [2]. Было показано [3], что скорость трансдифференцировки ацинарных клеток в β -клетки зависит как от степени экспрессии факторов транскрипции, так и от наличия воспаления в поджелудочной

железе. Образование новых β -подобных клеток происходит при ограничении воспаления.

Цель работы — оценить количество и размеры инсулин-продуцирующих клеток, локализованных в поджелудочной железе вне островков, а также оптическую плотность инсулина в них и в β -клетках островков, в условиях экспериментального диабета 2 типа и при модуляции активности макрофагов.

МЕТОДЫ

Эксперименты проводилось на 20 половозрелых крысах-самцах линии Wistar массой 300–350 г в соответствии с рекомендациями международных этических комитетов и Директивой Совета ЕС2010/63/EU. Животные содержались в условиях вивария с 12-часовым световым днём с неограниченным доступом к воде и пище. С целью моделирования диабета 2 типа животным трёх экспериментальных групп были сделаны интраперитонеально инъекции стрептозотоцина (“Sigma”, US) в дозе 65 мг/кг, с введением за 15 минут до этого никотинамида в дозе 110 мг/кг [4]. Первая группа была выведена из эксперимента через 30 суток, вторая — через 60. Четвёртой группе через 30 суток после введения стрептозотоцина была начата серия внутримышечных инъекций деривата аминоталгидразина в дозе 2 мг/кг (20 доз по схеме) [5]. Группа из 5 крыс была взята в качестве интактной. Животным из интактной группы вводился физиологический раствор по такой же схеме.

Ткань поджелудочной железы экспериментальных животных исследовалась иммуногистохимически с использованием антител к инсулину (ThermoFisher, США). Подсчитывалось количество инсулин + клеток в островках, в ацинарной части железы и в протоках. Оптическую плотность инсулина измеряли с использованием ПО Видео Тест Морфология 5.0. Статистический анализ материала проводили с помощью ПО Origin.Pro 9.0. При проверке статистических гипотез использовался уровень значимости 5% ($p < 0,05$). Данные представлены в виде среднее \pm ошибка среднего.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

При развитии экспериментального диабета количество β -клеток резко снижается (со $166,32 \pm 42,76$ клеток на мм^2 площади железы до $63,3 \pm 15,88$ и $32,19 \pm 16,24$ на 30-е и 60-е сутки развития диабета соответственно). Количество внеостровковых инсулин-синтезирующих кле-

ток (ВИСК) достоверно не меняется, причём средняя площадь одиночных ацинарных ВИСК возрастает (с $93,4 \pm 7,42$ мкм^2 у интактных животных до $123,59 \pm 7,3$ на 30-е сутки диабета). Введение АФГ приводит к увеличению количества β -клеток (до $103,11 \pm 32,75$) и протоковых ВИСК ($0,71 \pm 0,24$ у интактных животных, $0,5 \pm 0,25$ на 60-е сутки развития диабета и $0,8 \pm 0,37$ при введении АФГ) на квадратный миллиметр площади железы. Средняя площадь одиночных протоковых ВИСК возрастает ($50,44 \pm 9,98$ мкм^2 у интактных, $37,2 \pm 7,45$ и $47,8 \pm 4,62$ мкм^2 на 30-е и 60-е сутки диабета и $68,7 \pm 9,7$ мкм^2 при введении АФГ). Оптическая плотность инсулина увеличивается в β -клетках островков и ВИСК как протоковой, так и ацинарной локализации.

КРАТКОЕ ОБСУЖДЕНИЕ

При экспериментальном диабете из-за развивающейся гипергликемии происходит компенсаторное увеличение площади ИСК, возникших в ацинарной части поджелудочной железы в ходе ацино-инсулярной трансформации. Модуляция активности макрофагов АФГ приводит к снижению уровня воспаления в поджелудочной железе, вследствие чего усиливается образование ИСК в протоках железы, увеличиваются их размеры и функциональная активность.

Работа выполнена в рамках бюджетной темы ИИФ УрО РАН № АААА-А18-118020590107-0.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Xia B., Zhan X. R., Yi R., Yang B. Can pancreatic duct-derived progenitors be a source of islet regeneration? *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2009, Jun 12; 383(4): 383–5.
2. Иванова В. Ф., Пузырев А. А. Структурно-функциональные изменения в поджелудочной железе белой крысы при введении глюкозы. // *Морфология*, 2006, том 129, № 1, 67–71. [Ivanova V. F. I., Puzyryov A. A. Structure-functional changes in rat pancreas after glucose injection // *Morphologia*. 2006, vol 129, № 1, 67–71.]
3. Clayton H. W., Osipovich A. B., Stancill J. S., Schneider J. D., Vianna P. G., Shanks C. M., Yuan W., Gu G., Manduchi E., Stoekert C. J., Jr., Magnuson M. A. Pancreatic Inflammation Redirects Acinar to Beta Cell Reprogramming. *Cell Rep.*, 2016, Nov 15, 17(8): 2028–2041.
4. Спасов А. А., Воронкова М. П., Снигур Г. Л., Чепляева Н. И., Чепурнова М. В. Экспериментальная модель сахарного диабета типа 2. *Биомедицина*, 2011, № 3, с. 12–18. [Spasov A. A., Voronkova M. P., Snigur G. L., Cheplyaeva N. I., Chepurnova M. V. Experimental model of diabetes mellitus type 2 // *Bio-medicine*. 2011, № 3, 12–18].

5. Danilova I. G., Bulavintceva T. S., Gette I. F., Medvedeva S. Y., Emelyanov V. V., Abidov M. T. Partial recovery from alloxan-induced diabetes by sodium phthalhy-

drazide in rats. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 2017, 95, 103–110.

**MANIFESTATION OF REGENERATORY POTENCIAL
OF EXTRA-ISLET INSULIN-PRODUCING PANCREATIC CELLS
AT THE EXPERIMENTAL DIABETES TYPE2 AND AT ADMINISTRATION
OF 3-AMINOPHTHALHYDRASIDE**

© 2019 K. V. Sokolova^{1,2*}, I. F. Gette^{1,2}, V. V. Emelyanov²,
M. T. Abidov³

E-mail: kssokolova@bk.ru

¹*Federal State Budget Institution of Science «Institute of Immunology and Physiology»
Ural Branch Russian Academy of Science, Yekaterinburg, Russia;*

²*Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education «Ural Federal University
named after the first President of Russia B. N. Yeltsin», Yekaterinburg, Russia*

³*Institute of Immunopathology, Ljubljana, Slovenia*

Received: 12.03.2019. **Accepted:** 26.03.2019

Restoration of quantity, size of cells and their functional activity reflect the possibility of tissue to regenerate. 3-aminophtalhydrazide (APH), which effects to the macrophage activation: classic vs. alternative, (M1→M2), increases quantity and sizes of insulin-producing cells, localized in pancreatic ducts. Besides, APH leads to increase of optical density of insulin both in beta-cells and insulin-producing cells, located in acinar part of the pancreas and in ducts.

Key words: extra-islet insulin-producing cells, macrophages, aminophtalhydrazide, diabetes type 2

Authors:

Sokolova K. V., ✉ jun.res., Laboratory of morphology and biochemistry, IIP UB RAS, Russia; PhD student, Department of medical biochemistry and biophysics, UrFU, Yekaterinburg, Russia. **E-mail:** kssokolova@bk.ru;

Emelyanov V. V., PhD, assistant professor, Department of Immunochemistry, Department of Medical Biochemistry and biophysics, UrFU, Yekaterinburg, Russia;

Gette I. F., PhD, sen.res., Laboratory of morphology and biochemistry, IIP UB RAS, Russia; sen.res., Department of Immunochemistry, UrFU, Yekaterinburg, Russia;

Abidov M. T., DM, Institute of Immunopathology, Ljubljana, Slovenia.

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК, НАГРУЖЕННЫХ АУТОЛОГИЧНЫМ ЛИЗАТОМ ОПУХОЛИ БОЛЬНЫХ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫМИ ГЛИОМАМИ, НА АКТИВАЦИЮ АНТИГЕН-СПЕЦИФИЧЕСКОГО Т-КЛЕТОЧНОГО ИММУННОГО ОТВЕТА *IN VITRO*

© 2019 г. Е. Д. Соловьева¹, Т. В. Тыринова^{2*}, А. В. Калиновский, С. В. Мишинов⁴, С. В. Чернов³, В. В. Ступак⁴

*E-mail: ct_lab@mail.ru

¹Новосибирский государственный университет Новосибирск, Россия;

²ФГБНУ «НИИ фундаментальной и клинической иммунологии», Новосибирск, Россия;

³ФГБУ «Федеральный центр нейрохирургии» МЗ РФ, Новосибирск, Россия;

⁴ФГБУ «НИИ Травматологии и ортопедии им. Я. Л. Цивьяна» МЗ РФ, Новосибирск, Россия

Поступила: 20.03.2019. Принята: 05.04.2019

В настоящей работе было показано, что IFN α -индуцированные ДК (ИФН-ДК), нагруженные лизатом аутологичных опухолевых клеток пациентов с злокачественными глиомами головного мозга (ДК_{лиз}) более эффективно стимулируют пролиферативный ответ аутологичных Т-клеток по сравнению с ненагруженными ИФН-ДК (ДК_{лпс}), не вызывая при этом значимую индукцию апоптоза CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток. Установлено, что ДК_{лиз} индуцируют активацию цитотоксических CD8⁺ Т-клеток (в тесте дегрануляции) в культурах аутологичных мононуклеарных клеток анализируемых больных.

Ключевые слова: дендритные клетки, интерферон альфа, глиобластома

DOI: 10.31857/S102872210006537-5

Адрес: 630099 Новосибирск, ул. Ядринцевская, д. 14, ФГБНУ «НИИ фундаментальной и клинической иммунологии».

Тыринова Тамара Викторовна, Тел./факс: +7(383)2282101

E-mail: ct_lab@mail.ru

Авторы:

Соловьева Е.Д., студентка 6-го курса Института медицины и психологии В. Зельмана, Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия;

Тыринова Т.В., к.б.н., научный сотрудник лаборатории клеточной иммунотерапии ФГБНУ «НИИ фундаментальной и клинической иммунологии», Новосибирск, Россия;

Калиновский А.В., к.м.н., зав. операционным блоком ФГБУ «Федеральный центр нейрохирургии» МЗ РФ, Новосибирск, Россия;

Мишинов С.В., к.м.н., врач-нейрохирург отделения нейрохирургии, ФГБУ «Новосибирский НИИ травматологии и ортопедии им. Я.Л. Цивьяна» МЗ РФ, Новосибирск, Россия;

Чернов С.В., к.м.н., зав. отделением нейроонкологии ФГБУ «Федеральный центр нейрохирургии» МЗ РФ, Новосибирск, Россия;

Ступак В.В., д.м.н., профессор, зав. отделением нейрохирургии ФГБУ «Новосибирского НИИ травматологии и ортопедии им. Я.Л. Цивьяна» МЗ РФ Новосибирск, Россия.

АКТУАЛЬНОСТЬ

ДК являются главными «профессиональными» антиген-презентирующими клетками, способными индуцировать генерацию Th1/провоспалительных и цитотоксических CD8⁺ Т-лимфоцитов, что успешно используется для создания вакцин на основе ДК в иммунотерапии злокачественных опухолей [1]. При этом важным аспектом является выбор опухолевого антигена для нагрузки незрелых ДК *ex vivo*, что позволило бы индуцировать эффективный АГ-специфический иммунный ответ.

Целью настоящей работы явилось изучение *in vitro* способности IFN α -индуцированных ДК (ИФН-ДК), нагруженных лизатом злокачественных глиом головного мозга, активировать специфический Т-клеточный ответ против опухолевых антигенов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование были включены 5 пациентов с глиомами головного мозга высокой степени злокачественности (Grade IV) в возрасте от 48 до 67 лет. ДК получали путем культивирования прилипающей фракции моноклеарных клеток (МНК) в присутствии GM-CSF и IFN α в течение 3–4 сут, последующей нагрузкой аутологичным лизатом опухоли (0,1 мг/мл по белку) в течение 1 часа в качестве антигенного материала и добавлением ЛПС на 24 ч для индукции созревания ДК (ДК_{лиз}). Контрольными культурами служили ненагруженные лизатом ЛПС-стимулированные ИФН-ДК (ДК_{лпс}). Пролиферативный ответ Т-клеток оценивали радиометрически по включению ³H-тимидина в смешанной культуре лимфоцитов (СКЛ) при культивировании аутологичных МНК больных с ИФН-ДК в соотношении 10:1. Апоптоз Т-клеток оценивали в 72-часовой ауто-СКЛ методом проточной цитометрии по экспрессии Annexin V и Propidium Iodide (PI) в гейте CD3⁺CD4⁺ и CD3⁺CD8⁺ клеток. Генерацию АГ-специфических цитотоксических клеток оценивали с помощью метода дегрануляции проточной цитометрией по уровню экспрессии CD107a в гейте CD3⁺CD8⁺ клеток.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Пролиферативный ответ аутологичных МНК, стимулированных ДК_{лиз}, почти в два раза превышал аналогичный показатель в культурах МНК, стимулированных контрольными ДК_{лпс} (Me 705,9 имп/мин vs 375,3 имп/мин; $p < 0,05$). Исследование апоптоз-индуцирующей активности ДК показало, что со-культивирование аутологичных МНК с ДК_{лиз} больных злокаче-

ственными глиомами не сопровождалось значимыми изменениями относительного количества Annexin V⁺PI⁻ (ранний апоптоз) среди CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток в сравнении с контрольными нестимулированными МНК больных ($p = 0,34$ и $p = 0,89$, соответственно). В случае активации МНК интактными ДК_{лпс} отмечался тренд к увеличению количества CD4⁺ Т-клеток в стадии раннего апоптоза ($p = 0,08$). Относительное количество Annexin V⁺PI⁺ (поздний апоптоз) и Annexin V⁻PI⁺ (некроз) клеток было сопоставимо в нестимулированных МНК и МНК, активированных ДК_{лиз}, и не превышало 1–2%. Наибольшее количество CD3⁺CD8⁺CD107a⁺ клеток в ответ на 5-часовое представление ауто-АГ наблюдался в культурах МНК предварительно инкубированных с аутологичными ДК_{лиз} больных глиомами. Индекс стимуляции дегрануляции CD8⁺ Т-клеток, праймированных ДК_{лпс}, составлял $(1,0 \pm 0,06)$ расч. ед, тогда как для ДК_{лиз} аналогичный показатель был в среднем $(3,5 \pm 1,3)$ расч. ед ($p < 0,05$).

Таким образом, ДК больных глиобластомами, нагруженные лизатом аутологичных опухолевых клеток, способны индуцировать антиген-специфический Т-клеточный ответ *in vitro*, проявляющийся усилением пролиферации Т-клеток, активацией цитотоксических Т-клеток, не стимулируя при этом процесс апоптоза Т-клеток.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Назаркина Ж. К., Лактионов П. П. Получение дендритных клеток для иммунотерапии раковых заболеваний. Биомедицинская химия, Новосибирск 2015, 30–40. [Nazarkina Zh. K., Laktionov P. P. Preparation of dendritic cells for cancer immunotherapy. Biomedical chemistry, Novosibirsk 2015, P. 30–40].

THE STUDY OF ABILITY OF DENDRITIC CELLS LOADED
WITH AUTOLOGICAL TUMOR LYSATE OF PATIENT
SWITHHIGH-GRADE GLIOMA TO ACTIVATE
ANTIGEN-SPECIFIC T-CELL RESPONSE *IN VITRO*

© 2019 E. D. Soloveva¹, T. V. Tyrinova^{2*}, A. V. Kalinovsky³,
S. V. Mishinov⁴, S. V. Chernov³, V. V. Stupak⁴

*E-mail: ct_lab@mail.ru

¹Novosibirsk state university, Novosibirsk, Russia;

²Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russia;

³Federal Neurosurgical Center, Ministry of Health of the Russian Federation, Novosibirsk, Russia;

⁴«Novosibirsk Research Institute of Traumatology and Orthopedics them. Y. L. Tsivyana»,
Ministry of Health of the Russian Federation, Novosibirsk, Russia

Received: 20.03.2019. Accepted: 05.04.2019

In the present work we demonstrated that IFN α -induced dendritic cells (IFN-DCs) loaded with a lysate of autologous tumor cells of high-grade glioma patients (DC_{LYS}) more effectively stimulated the proliferative response of autologous T-cells compared with unloaded IFN-DCs (DC_{LPS}) and did not induce apoptosis of CD4⁺ and CD8⁺ T cells. Moreover, DC_{LYS} activated cytotoxic CD8⁺ T cells (in the degranulation test) in cultures of autologous mononuclear cells of studied patients.

Key words: dendritic cells, interferon alpha, glioblastoma

Authors:

Soloveva E. D., 6th year student of the Institute of Medicine and Psychology V. Zelman, Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia;

Tyrinova T. V., ✉ PhD, researcher, laboratory of cellular immunotherapy, Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russia. E-mail: ct_lab@mail.ru;

Kalinovsky A. V., PhD, head of surgical unit, Federal Neurosurgical Center, Ministry of Health of the Russian Federation, Novosibirsk, Russia;

Mishinov S. V., PhD, neurosurgeon, neurosurgery department, «Novosibirsk Research Institute of Traumatology and Orthopedics them. Y. L. Tsivyana», Ministry of Health of the Russian Federation, Novosibirsk, Russia;

Chernov S. V., PhD, head of neurooncology department, Federal Neurosurgical Center, Ministry of Health of the Russian Federation, Novosibirsk, Russia;

Stupak V. V., MD, professor, head of neurosurgery department, «Novosibirsk Research Institute of Traumatology and Orthopedics them. Y. L. Tsivyana», Ministry of Health of the Russian Federation, Novosibirsk, Russia.

СУБПОПУЛЯЦИОННЫЙ СОСТАВ ЛИМФОЦИТОВ У ПАЦИЕНТОВ С МЕТАБОЛИЧЕСКИМ СИНДРОМОМ И ЕГО ИЗМЕНЕНИЕ ПОД ВЛИЯНИЕМ АДИПОКИНОВ В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ УСЛОВИЯХ

© 2019 г. В. А. Сумеркина*, Л. Ф. Телешева, Е. С. Головнева,
И. Л. Батурина, Ю. В. Наймушина

*E-mail: veronika.sumerkina@mail.ru

ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет»
Минздрава России, Челябинск, Россия

Поступила: 14.03.2019. Принята: 28.03.2019

Важная роль в регуляции иммунных взаимодействий при метаболическом синдроме (МС) принадлежит лептину и адипонектину, их уровень в периферической крови хорошо известен, в то время как особенности влияния данных медиаторов на лимфоциты человека изучены недостаточно. В работе проведена оценка субпопуляционного состава лимфоцитов у пациентов с метаболическим синдромом *in vivo*, а также изучена экспрессия маркеров активации лимфоцитов периферической крови в эксперименте *in vitro* при инкубации с лептином и адипонектином в концентрациях, приближенных к таковым при метаболическом синдроме.

Ключевые слова: метаболический синдром, лептин, адипонектин, субпопуляционный состав лимфоцитов

DOI: 10.31857/S102872210006536-4

Адрес: 454092 Челябинск, ул. Воровского, 64, ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России, ЦНИЛ, Сумеркина Вероника Андреевна. Тел.: 8 906 866 33 50 (моб.).

E-mail: veronika.sumerkina@mail.ru

Авторы:

Сумеркина В. А., к.м.н., ведущий научный сотрудник ЦНИЛ ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России, Челябинск, Россия;

Телешева Л. Ф., д.м.н., профессор, профессор кафедры Микробиологии, вирусологии, иммунологии и клинической лабораторной диагностики ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России, Челябинск, Россия;

Головнева Е. С., д.м.н., доцент, профессор кафедры Нормальной физиологии имени акад. Ю. М. Захарова ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России, Челябинск, Россия;

Батурина И. Л., к.м.н., старший научный сотрудник НИИ иммунологии ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России, Челябинск, Россия;

Наймушина Ю. В., к.м.н., доцент кафедры Факультетской хирургии ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России, Челябинск, Россия.

из которых являются медиаторами воспаления (лептин, ИЛ-1 β , ИЛ-6, ФНО- α , МСР-1 и другие). Важная роль в регуляции иммунных взаимодействий при МС принадлежит лептину и адипонектину, их уровень в периферической крови хорошо известен, в то время как особенности влияния данных медиаторов на лимфоциты человека изучены недостаточно.

Цель работы. Оценить субпопуляционный состав лимфоцитов у пациентов с метаболическим синдромом *in vivo*, а также определить особенности влияния лептина и адипонектина на активацию лимфоцитов периферической крови пациентов с МС в экспериментальных условиях *in vitro*.

МЕТОДЫ

Исследование выполнено на 70 пациентах обоего пола в возрасте от 18 до 44 лет с МС (группа 1). Группу сравнения (группа 2 – 71 человек) составили пациенты без абдоминального ожирения, избытка массы тела и дополнительных критериев МС. Методом проточной цитометрии

АКТУАЛЬНОСТЬ

Нарушения иммунного статуса при метаболическом синдроме (МС) связаны с особенностями физиологии жировой ткани, синтезирующей и секретирующей адипокины, многие

были выделены и проанализированы субпопуляции лимфоцитов: CD3⁺CD45⁺, CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺, CD3⁺CD56⁺, CD3⁻CD56⁺, CD3⁻CD19⁺. Анализировали активированный пул клеток с фенотипами CD3⁺CD25⁺ и CD3⁺HLA-DR⁺. В эксперименте *in vitro* оценивали профиль активации лимфоцитов периферической крови пациентов 1 группы (n=10) и 2 группы (n=10) после культивирования в питательной среде в присутствии высокой концентрации лептина и низкой концентрации адипонектина (лептин 50 нг/мл; адипонектин 5 мкг/мл). Методом проточной цитофлуориметрии оценивали активированный пул клеток с фенотипами CD3⁺, CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺, CD4⁺CD8⁺, CD3⁺CD25⁺, CD3⁺CD4⁺CD25⁺, CD3⁺CD8⁺CD25⁺, CD3⁺HLA-DR⁺, CD3⁺CD4⁺HLA-DR⁺, CD3⁺CD8⁺HLA-DR⁺. Проводили сравнение показателей, полученных после культивирования, с базовыми параметрами интактных лимфоцитов. Статистическую обработку результатов выполняли с помощью пакета прикладных программ STATISTICA 7,0 (StatSoft Inc., 2006, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ

У пациентов группы 1 в условиях *in vivo* установлено изменение содержания адипокинов – повышение уровня лептина (33,8 (11,9–62,5) нг/мл; группа сравнения 9,0 (4,5–15,1) нг/мл) и снижение адипонектина (7,0 (5,3–9,1) мкг/мл; группа сравнения 8,6 (7,1–12,6) мкг/мл), а также рост соотношения лептин/адипонектин (4,2 (1,7–9,3); группа сравнения 1,0 (0,5–1,8)). Так же у пациентов с МС установлены изменения клеточного звена иммунитета – повышение абсолютного содержания В-лимфоцитов (245 (198–340) кл/мкл; группа сравнения 204 (152–278) кл/мкл), CD3⁺HLA-DR⁺-лимфоцитов (43 (20–76) кл/мкл; группа сравнения 20 (9–33) кл/мкл) и CD3⁺CD25⁺-лимфоцитов (71 (55–126) кл/мкл; группа сравнения 49 (34–88) кл/мкл).

В экспериментальных условиях *in vitro* среди лимфоцитов периферической крови пациентов с МС после инкубации с лептином в концентрации 50 нг/мл обнаружено снижение числа клеток с фенотипом CD4⁺CD8⁺ (1,1 (0,8–1,4)%, контроль 1,2 (0,9–1,4)%), CD4⁺CD25⁺ (17 (6–39) кл/мкл, контроль 35 (12–45) кл/мкл), CD3⁺HLA-DR⁺ (12 (9–19) кл/мкл, контроль 28 (14–53) кл/мкл), CD4⁺HLA-DR⁺ (5 (3–12) кл/мкл, контроль 18 (13–39) кл/мкл). В группе сравнения высокие концентрации лептина в среде вызывали увеличение количества лимфоцитов CD3⁺CD25⁺ (17

(7–31) кл/мкл, контроль 8 (5–10) кл/мкл) и CD8⁺CD25⁺ (7 (2–15) кл/мкл, контроль 1 (0–2) кл/мкл). Известно, что Т-лимфоциты несут на своей поверхности рецептор к лептину Ob-R [1, 2], а взаимодействие лептина с рецептором вызывает активацию CD25⁺ (рецептор к ИЛ-2) на CD4⁺ и CD8⁺ лимфоцитах [3]. Наши результаты, полученные у пациентов группы сравнения, согласуются с литературными данными, в то время как у пациентов с МС высокая концентрация лептина в инкубационной среде, напротив, вызывала угнетение активации лимфоцитов.

Инкубация лимфоцитов пациентов с МС в присутствии низкой концентрации адипонектина (5 мкг/мл) индуцировала повышение числа клеток с фенотипом CD3⁺CD25⁺ (14 (5–35) кл/мкл, контроль 14 (8–35) кл/мкл) и CD8⁺CD25⁺ (4 (1–10) кл/мкл, контроль 2 (1–8) кл/мкл).

Сочетанное добавление лептина (50 нг/мл) и адипонектина (5 мкг/мл) в среду инкубации лимфоцитов периферической крови пациентов с метаболическим синдромом приводило к росту количества CD8⁺HLA-DR⁺-лимфоцитов (1,0 (0,8–1,8)%, контроль 0,7 (0,3–1,1)%). В группе сравнения в указанных условиях *in vitro* установлено увеличение клеток с фенотипом CD3⁺CD25⁺ (18 (6–28) кл/мкл, контроль 8 (5–10) кл/мкл) и CD8⁺CD25⁺ (8 (1–24) кл/мкл, контроль 1 (0–2) кл/мкл). Таким образом, культивирование лимфоцитов пациентов с МС в присутствии низкой концентрации адипонектина (как изолированно, так и в сочетании с высокой концентрацией лептина) вызывает индукцию экспрессии маркеров активации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Fujita Y., Murakami M., Ogawa M. Y., Masuzaki H., Tanaka M., Ozaki S., Nakao K., Mimori T. Leptin inhibits stress-induced apoptosis of T lymphocytes. *ClinExpImmunol.* 2002, 128 (1), 21–26.
2. Sánchez-Margalet V., Martín-Romero C., González-Yanes C., Goberna R., Najib S., Gonzalez-Yanes C. Leptin receptor (Ob-R) expression is induced in peripheral blood mononuclear cells by *in vitro* activation and *in vivo* in HIV-infected patients. *ClinExpImmunol.* 2002, 129 (1), 119–124.
3. Орлова Е. Г., Ширшев С. В. Роль лептина в контроле экспрессии активационных мембранных молекул разными субпопуляциями Т-лимфоцитов. Известия Российской академии наук. Серия биологическая. 2009, 4, 401–405. [Orlova E. G., Shirshov S. V. The role of leptin in the control of the expression of activation membrane molecules by different T-cell subpopulations. *Biology Bulletin.* 2009, 4, 401–405].

**LYMPHOCYTE SUBPOPULATION PROFILE IN PATIENTS
WITH METABOLIC SYNDROME AND IT'S CHANGE UNDER
THE INFLUENCE OF ADIPOKINS IN EXPERIMENTAL CONDITIONS**

© 2019 V. A. Sumerkina*, L. F. Telesheva, E. S. Golovneva,
I. L. Baturina, Yu. V. Naimushina

*E-mail: veronika.sumerkina@mail.ru

Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «South-Urals State
Medical University» of the Ministry of Healthcare of Russian Federation, Chelyabinsk, Russia

Received: 14.03.2019. **Accepted:** 28.03.2019

An important role in the regulation of immune interactions in metabolic syndrome (MS) belongs to leptin and adiponectin, their levels in peripheral blood are well known, while the specific effects of these mediators on human lymphocytes are not well understood. In this work, we evaluated the subpopulations of lymphocytes in patients with metabolic syndrome *in vivo*, and studied the expression of activation markers of peripheral blood lymphocytes after incubation with leptin and adiponectin at concentrations close to those of metabolic syndrome.

Key words: metabolic syndrome, leptin, adiponectin, subpopulations of lymphocytes

Authors:

Sumerkina V. A., ✉ PhD, Leading Researcher of the Central Research Laboratory FSBEIHE SUSMU of the Ministry of Healthcare of Russian Federation, Chelyabinsk, Russia. **E-mail:** veronika.sumerkina@mail.ru;

Telesheva L. F., Ph D., professor of Department of Microbiology, Virology, Immunology and Clinical Laboratory Diagnostics FSBEIHE SUSMU of the Ministry of Healthcare of Russian Federation, Chelyabinsk, Russia;

Golovneva E. S., Ph D., professor of Department of Normal Physiology named after academician Yu. M. Zakharov FSBEIHE SUSMU of the Ministry of Healthcare of Russian Federation, Chelyabinsk, Russia;

Baturina I. L., PhD, Senior Researcher of Immunology Research Institute FSBEIHE SUSMU of the Ministry of Healthcare of Russian Federation, Chelyabinsk, Russia;

Naimushina Yu. V., PhD, Associate Professor of Department of Faculty Surgery FSBEIHE SUSMU of the Ministry of Healthcare of Russian Federation, Chelyabinsk, Russia.

МОДЕЛЬ ВЛИЯНИЯ ГИПОКСИИ НА КЛЕТОЧНУЮ СОСТАВЛЯЮЩУЮ И СИНТЕЗ КОМПОНЕНТОВ ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА В КУЛЬТУРЕ ФИБРОБЛАСТОВ

© 2019 г. Ю. Г. Суховой¹, Е. Г. Костоломова^{1,2*}, И. Г. Унгер¹,
Т. В. Акунеева¹, И. А. Аптекарь³

*E-mail: lenakost@mail.ru

¹ООО «Тюменский филиал института клинической иммунологии», Тюмень, Россия;

²ФГБОУ ВО «Тюменский государственный медицинский университет»
Минздрава РФ, Тюмень, Россия;

³АНО «Тюменский институт мануальной медицины», Тюмень, Россия

Поступила: 14.03.2019. Принята: 29.03.2019

Установлено, что культивирование фибробластов в условиях гипоксии приводит к снижению их морфологической гетерогенности, повышению пролиферативной активности и жизнеспособности клеток. Вызывает угнетение синтеза компонентов внеклеточного матрикса (коллагена и эластина) и снижение экспрессии рецептора гиалуроновой кислоты (CD44). Длительность гипоксии обуславливает степень снижения.

Ключевые слова: гипоксия, фибробласты, проточная цитометрия, коллаген, эластин

DOI: 10.31857/S102872210006535-3

Адрес: 625027, Тюмень, ул. Котовского, 5. ООО «Тюменский филиал института клинической иммунологии», Костоломовой Елене Геннадьевне. Тел.: +7 904 493 06 74
E-mail: lenakost@mail.ru

Авторы:

Суховой Ю. Г., д.м.н., профессор, директор ООО «Тюменский филиал института клинической иммунологии», Тюмень, Россия;

Костоломова Е. Г., к.б.н., ассистент кафедры патологической физиологии ФГБОУ ВО «Тюменский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, Тюмень, Россия;

Унгер И. Г., к.м.н., в.н.с. ООО «Тюменский филиал института клинической иммунологии», Тюмень, Россия;

Акунеева Т. В., с.н.с. ООО «Тюменский филиал института клинической иммунологии», Тюмень, Россия;

Аптекарь И. А., к.м.н. директор АНО «Тюменский институт мануальной медицины», Тюмень, Россия.

ВВЕДЕНИЕ

Влияние гипоксии на клетки широко изучается [1]. Но важно не только состояние клеточных элементов, но и внеклеточного матрикса (содержание коллагена, эластина и гиалуроновой кислоты).

Цель исследования: изучить изменения морфофункциональной активности фибробластов и продукцию ими компонентов внеклеточного

матрикса при моделировании различных режимов гипоксии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Первичную культуру дермальных фибробластов получали из биоптатов кожи путем механической дезагрегации и последующей ферментативной обработки. Стандартное культивирование проводили при 37 °С в атмосфере 5% CO₂ с использованием CO₂-инкубатора (Sanyo, Япония). Для создания пониженного содержания кислорода в среде использовали CO₂-инкубатор и герметичную камеру (StemCell Technologies, США), модифицированную датчиками давления и концентрации O₂, которую продували газовой смесью (95% N₂, 5% CO₂) до установления 0% концентрации кислорода. В работе использовали клетки 4–6 пассажа. Каждый эксперимент воспроизводился 15 раз с дублированием аналитических измерений. Прижизненную визуализацию фибробластов, жизнеспособность клеток, окрашенных трипановым синим проводили с помощью микроскопа СКХ-41 (Olympus, Япония). Контроль за процессами апоптоза и некроза проводили, оценивая количество

апоптотических и некротических клеток и фазы клеточного цикла определяли методом проточной цитофлуориметрии на проточном цитофлуориметре CytoFLEX (Beckman Coulter, США). Иммунофенотипирование культивируемых фибробластов проводили на проточном цитофлуориметре CytoFLEX (Beckman Coulter, США) с помощью моноклональных антител CD29, CD44, CD90, CD105, CD34, CD45, CD31, HLA-DR [2]. Пролиферативную активность изучали по времени удвоения популяции клеток и состоянию их клеточного цикла [3]. Способность фибробластов к продукции коллагена первого типа (COL1) и эластина определяли в супернатанте после каждого пассажа методом иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием тест-систем (Cloud-Clone Corp., USA) по методике производителя.

Моделирование гипоксии

Экспозицию фибробластов в среде с измененным газовым составом осуществляли однократно в течение: 1 часа, 12 часов и 24 часов. Затем клетки культивировали в стандартных условиях при 37 °С в атмосфере 5% CO₂ с использованием CO₂-инкубатора в течение 1, 12, 24, 48, и 72 часов.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программ «Excel» и «Statistica 7.0» для WinXP. Статистическую достоверность различий между двумя группами данных оценивали с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни при выбранном уровне значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для проведения эксперимента в работу были взяты клетки 6 пассажа с высокой функциональной активностью (максимальный из 18 пассажей уровень выработки коллагена и эластина). Полученная клеточная популяция гетерогенна, так как выделенные фибробласты находятся на разных стадиях развития (небольшие веретеновидные активно делящиеся клетки-предшественники более крупные веретеновидные созревающие клетки; крупные плащевидные зрелые фиброциты). По результатам анализа выявлено, что основной пул клеток в культуре находится в G0-фазе, что соответствует характеристике дифференцированных фибробластов. Индекс ДНК в среднем составил 1,96, что характеризует нормально развивающуюся культуру. Субпопуляционный состав культуры фибробластов

характеризовался экспрессией мезенхимных (CD44, CD29, CD90, CD105) и отсутствием эпителиальных, гемопоэтических и лейкоцитарных маркеров (CD31, CD34, CD45, HLA-DR).

Результаты исследования показали, что наименее повреждающее действие на клетки оказывает гипоксия в течение 1 часа. Пониженное содержание кислорода вызывает в клетках слабый окислительный стресс, адаптация к которому, вероятно, приводит к повышению устойчивости клеток к моделируемому окислительному стрессу. Установлено, что при культивировании фибробластов в условиях гипоксии в течение 1 часа по сравнению с нормоксией наблюдается значительный прирост клеток: $91 \pm 5\%$ и $77 \pm 4\%$ в контроле соответственно. Кроме того, в условиях гипоксии наблюдаются антиапоптотический (% AnnV⁺ клеток: контроль $9,7 \pm 1,2\%$; гипоксия $4,5 \pm 1,3\%$) и антинекротический (% PI⁺ клеток: $3,6 \pm 1,2\%$ и $1,3 \pm 0,3\%$, соответственно) эффекты, что проявляется в повышении количества жизнеспособных фибробластов (AnnV-PI⁻: $91 \pm 2,39\%$ и $95,5 \pm 0,95\%$, соответственно).

При культивировании фибробластов в условиях гипоксии фенотипические особенности клеток сохраняются после часовой экспозиции культуры в условиях гипоксии, последующие 12- и 24-часовая экспозиции сопровождаются снижением доли клеток, экспрессирующих CD44 ($41 \pm 13\%$; $20 \pm 11\%$ и $90 \pm 7\%$ в контроле), не вызывая изменения количества клеток, экспрессирующих CD105, CD29 и CD90. Дальнейшее культивирование в условиях нормоксии не оказывает влияния на долю CD29⁺, CD105⁺ и CD90⁺ клеток и способствует восстановлению количества CD44⁺ до исходного уровня через 48 часов (12-часовая гипоксия) и через 72 часа (24-часовая гипоксия). Важным свойством, характеризующим функциональное состояние клеточной популяции, является синтез коллагена и эластина фибробластами. В контрольной группе содержание коллагена и эластина в супернатанте составило 364 ± 25 пг/мл и 270 ± 19 нг/мл соответственно. Кратковременная (1 час) гипоксия не оказывает значимого влияния на продукцию фибробластами коллагена и эластина в сравнении с контрольной группой (200 ± 16 пг/мл и 262 ± 25 нг/мл). Однако после помещения культуры в условия нормоксии (t 37 °С в атмосфере 5% CO₂) наблюдается резкое угнетение синтеза данных веществ с постепенным восстановлением их продукции до нормальных единиц после 48 часов культивирования. При более длительной гипоксии (12 часов) наблюдалось

значительное угнетение синтеза как коллагена ($19 \pm 1,5$ пг/мл), так и эластина ($8 \pm 0,4$ нг/мл) фибробластами. Последующее культивирование в нормальных условиях (95% воздуха + 5% CO₂) приводит лишь к умеренному восстановлению продукции фибробластами данных веществ.

После нахождения культуры фибробластов в условиях полной гипоксии в течение 24 часов происходит практически полное угнетение синтеза коллагена ($0,7 \pm 0,3$ пг/мл) и эластина ($1 \pm 0,2$ нг/мл) с последующим незначительным восстановлением продукции эластина и полным угнетением синтеза коллагена при культивировании в условиях нормоксии.

ВЫВОДЫ

Гипоксия вызывает изменение фенотипа клеток в культуре, а именно: снижение экспрессии рецептора гиалуроновой кислоты (CD44).

Длительность гипоксии влияет на степень угнетения экспрессии маркера CD44 (чем длительнее гипоксия, тем значительнее угнетение и длительнее восстановление).

Гипоксия оказывает влияние на продукцию фибробластами компонентов внеклеточного

матрикса – коллагена и эластина, обуславливая снижение выработки этих факторов тем сильнее, чем длительнее гипоксия.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Шабанов П. Д., Зарубина И. В., Новиков В. Е., Цыган В. Н. Метаболические корректоры гипоксии. – СПб., 2010. – 916 с. [Shabanov P. D., Zarubina I. V., Novikov V. Ye., Tsygan V. N. Metabolicheskiye korrektery gipoksii. SPb., 2010. – 916 с.]
2. Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F., Krause D., Deans R., Keating A., Prockop D. J., Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006; 8(4):315–7
3. Кудрявцев И. В., Хайдуков С. В., Зурочка А. В., Черешнев В. А. Применение метода проточной цитофлуориметрии для оценки пролиферативной активности клеток в медико-биологических исследованиях. *Российский иммунологический журнал*, 2012; 6(14), № 3–1:21–40. [Kudryavtsev I. V., Khaydukov S. V., Zurochka A. V., Chereshevnev V. A. Application of the method of flow cytometry for the estimation of proliferative activity of cells in medical and biological researches. *Russian journal of immunology*, 2012; 6(14), № 3–1:21–40].

MODEL OF INFLUENCE HYPOXIAS ON THE CELLULAR COMPONENT AND SYNTHESIS COMPONENTS EXTRACELLULAR MATRIX IN CULTURE FIBROBLASTS

© 2019 U. G. Suhovej¹, E. G. Kostolomova^{1,2*}, I. G. Unger¹, T. V. Akuneeva¹, I. A. Aptekar³

*E-mail: lenakost@mail.ru

¹«Tyumen filial of the Institute Clinical Immunology», Tyumen, Russia;
²FSBEI of Higher Education «Tyumen state medical university» of the Ministry of Healthcare of Russian Federation, Tyumen, Russia;

³ANO «Tyumen institute of manual medicine», Tyumen, Russia

Received: 14.03.2019. Accepted: 29.03.2019

It is established, that cultivation fibroblasts in conditions hypoxia leads to decrease in their morphological heterogeneity, increase proliferative to activity and viability of cells. Causes oppression of synthesis of components extracellular matrix (collagen and elastin) and decrease expression a receptor hyaluronic acids (CD44). Duration hypoxia causes a degree of decrease.

Key words: hypoxia, fibroblasts, flow cytometry, collagen, elastin

Authors:

Suhovej J. G., MD (Medicine), Professor, Director «Tyumen filial of the Institute Clinical Immunology», Tyumen, Russia;
Kostolomova E. G., PhD (Biology), the assistant to faculty of pathological physiology FSBEI of Higher Education «Tyumen state medical university» of the Ministry of Healthcare of Russian Federation, Tyumen, Russia. **E-mail:** lenakost@mail.ru;
Unger I. G., PhD (Medicine), leading research associate «Tyumen filial of the Institute Clinical Immunology», Tyumen, Russia;
Akuneeva T. V., senior research associate «Tyumen filial of the Institute Clinical Immunology», Tyumen, Russia;
Aptekar' I. A., PhD (Medicine), Director ANO «Tyumen institute of manual medicine», Tyumen, Russia.

ЭКСПРЕССИЯ РЕЦЕПТОРОВ К СОСУДИСТО-ЭНДОТЕЛИАЛЬНОМУ ФАКТОРУ РОСТА-1 (VEGFR-1) И ИХ РОЛЬ В РЕГУЛЯЦИИ ПРОЛИФЕРАЦИИ Т-ЛИМФОЦИТОВ

© 2019 г. **Е. А. Ташкина^{1*}, О. Ю. Леплина¹, Е. В. Баторов¹, А. А. Останин¹, Н. М. Пасман²**

*E-mail: ct_lab@mail.ru

¹ФГБНУ «НИИ фундаментальной и клинической иммунологии», Новосибирск, Россия;

²«Новосибирский национальный исследовательский государственный университет» Новосибирск, Россия

Поступила: 15.03.2019. Принята: 02.04.2019

В работе исследована экспрессия рецепторов к сосудисто-эндотелиальному фактору роста-1 (VEGFR-1) на CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов доноров в культурах мононуклеарных клеток, а также влияние фактора роста плаценты (PIGF) на пролиферацию Т-клеток. Установлено, что свежeweделенные Т-клетки характеризуются низкой экспрессией VEGFR-1, которая возрастает при спонтанном культивировании Т-клеток и, в наибольшей степени, при активации Т-лимфоцитов aCD3 антителами. Максимальное возрастание VEGFR-1 –позитивных CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток регистрируется через 48 час. PIGF в широком диапазоне доз ингибирует пролиферацию aCD3-стимулированных Т-клеток, в одинаковой степени подавляя деление CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов.

Ключевые слова: рецепторы к сосудисто-эндотелиальному фактору роста-1(VEGFR-1), фактор роста плаценты (PIGF), Т-лимфоциты

DOI: 10.31857/S102872210006534-2

Адрес: 630091 Новосибирск, ул. Ядринцевская 14 ФГБНУ «НИИ фундаментальной и клинической иммунологии», Новосибирск, лаборатория клеточной иммунотерапии. Ташкина Екатерина Александровна.

Тел./факс: +7(383) 228 21 01, E-mail: ct_lab@mail.ru

Авторы:

Ташкина Е. А., аспирант лаборатории клеточной иммунотерапии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», Новосибирск, Россия;

Леплина О. Ю., д.м.н., ведущий научный сотрудник, лаборатория клеточной иммунотерапии, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», Новосибирск, Россия;

Баторов Е. В., к.м.н., научный сотрудник лаборатории клеточной иммунотерапии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», Новосибирск, Россия;

Останин А. А., д.м.н., профессор, главный научный сотрудник, лаборатория клеточной иммунотерапии, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», Новосибирск, Россия;

Пасман Н. М., д.м.н., профессор зав. кафедрой акушерства и гинекологии «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», Новосибирск, Россия.

ВВЕДЕНИЕ

Иммуномодулирующий эффект анти-ангиогенной терапии выявил важную роль факторов роста эндотелия сосудов (VEGF) в регуляции иммунной системы [1]. Большинство эффектов VEGF на функции Т-клеток опосредуются через связывание с рецепторами 2 типа (VEGFR-2) [2], тогда как участие VEGF рецептора 1 типа (VEGFR-1) в модуляции функций Т-клеток остается неясным.

Целью работы явилось изучение экспрессии VEGFR-1 на Т-клетках и оценка влияния плацентарного фактора роста (PIGF), являющегося селективным лигандом для VEGFR-1, на пролиферацию Т-лимфоцитов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование были включены 42 здоровых донора крови. Мононуклеарные клетки (МНК) периферической крови выделяли стандартно

методом градиентного центрифугирования. Для стимуляции клеток использовали растворимые моноклональные анти-CD3 антитела (aCD3, 1 мкг/мл). Рекombинантный PlGF добавляли в концентрации 0,1–100,0 нг/мл. Интенсивность пролиферации МНК оценивали радиометрически по включению ³H-тимидина. Пролиферацию CD4 и CD8 Т-клеток оценивали цитофлуориметрически по разведению флуоресцентной метки CFSE. Экспрессию VEGFR-1 оценивали методом проточной цитофлуориметрии с использованием FITC-(CD8), PE-(CD4) и APC-(VEGFR-1) меченных моноклональных антител (BD, США). Статистическую обработку данных проводили при помощи пакета прикладных программ Statistica 6.0. Данные представлены в виде медианы (Me) и интерквартильного диапазона (IQR).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Содержание CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток, несущих поверхностный VEGFR-1, в свежeweделенных МНК было низким и составляло соответственно 1,29 (0,2–4,4) и 0,51 (0,24–2,17)%. При культивировании МНК в отсутствие каких-либо стимулов доля CD4⁺VEGFR-1⁺ и CD8⁺VEGFR-1⁺ клеток достоверно возрастала, достигая через 48 часов соответственно 6,15% (2,0–11,0)%; $p_U=0,017$ и 7,8% (2,5–11,5)%; $p_U=0,027$), а к 72 часам снижалось. Стимуляция МНК aCD3 приводила к достоверно более выраженному усилению экспрессии VEGFR-1 на CD4 и CD8 Т-клетках на всех исследуемых временных точках. Максимальное возрастание VEGFR-1-позитивных CD4 и CD8 Т-клеток регистрировалось через 48 часов и составляло соответственно 15,0 (7,0–21,5) и 14,0 (6,0–21,0).

Добавление PlGF в культуры aCD3-стимулированных МНК достоверно ингибировало пролиферацию Т-клеток. Ингибирующий эффект PlGF проявлялся в широком диапазоне доз (от 0,1 до 100 нг/мл) и в концентрации 5 нг/мл составлял 45%, варьируя от 25 до 76%. При этом супрессорная активность PlGF не исчезала после однократного истощения моноцитов. При анализе влияния на пролиферацию отдельных субпопуляций Т-клеток ингибирующий эффект PlGF в отношении CD8⁺ Т-лимфоцитов составлял 28% (IQR 8–39%) и не отличался зна-

чимо от выраженности супрессорного эффекта PlGF на пролиферацию CD4⁺ Т-клеток (30%; IQR 25–40%; $p_U=0,3$). Таким образом, обе субпопуляции Т-лимфоцитов обладали чувствительностью к супрессорному действию PlGF.

Согласно данным литературы VEGF способен оказывать прямой ингибирующий эффект на пролиферацию Т-клеток через связывание с VEGFR-2 [2]. В то же время супрессорный эффект PlGF на функции Т-клеток опосредован связыванием фактора с VEGFR-1 на дендритных клетках и подавлением их созревания [3]. Полученные нами результаты впервые демонстрируют прямой ингибирующий эффект PlGF на пролиферацию Т-клеток, что подтверждается экспрессией VEGFR-1 Т-клетками и сохранной супрессорной активностью VEGFR-1 после истощения моноцитов. При этом выявление сопряженности между экспрессией VEGFR-1 и активацией Т-клеток отчасти объясняет противоречивые данные об экспрессии данного рецептора на Т-клетках в исследованиях других авторов [4, 5].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. *Ozao-Choy J., Ma G., Kao J., Wang G., Meseck M., Sung M., Schwartz M., Divino C., Pan P., Chen S.* The novel role of tyrosine kinase inhibitor in the reversal of immune suppression and modulation of tumor microenvironment for immune-based cancer therapies. *Cancer Res.* 2009, 69(6), 2514–2210.
2. *Voron T., Marcheteau E., Pernot S., Colussi O., Tartour E., Taieb J., Terme M.* Control of the immune response by pro-angiogenic factors. *Front Oncol.* 2014, 4, 70.
3. *Lin Y-L., Liang Y-C., Chiang B-L.* Placental growth factor down-regulates type 1 T helper immune response by modulating the function of dendritic cells. *Journal of Leukocyte Biology*, 2007, 82, 1473–2480.
4. *Ziogas A., Gavalas N., Tsiatas M., Tsitsilonis O., Politi E., Terpos E., Rodolakis A., Vlahos G., Thomakos N., Haidopoulos D., Antsaklis A., Dimopoulos M., Bamias A.* VEGF directly suppresses activation of T cells from ovarian cancer patients and healthy individuals via VEGF receptor Type 2. *Int J Cancer.* 2012, 130; 4, 857–864.
5. *Basu A., Hoerning A., Datta D., Edelbauer M., Stack M., Calzadilla K., Pal S., Briscoe D.* Cutting edge: vascular endothelial growth factor-mediated signaling in human CD45RO⁺CD4⁺ T cells promotes Akt and ERK activation and costimulates IFN-gamma production. *J Immunol.* 2010, 184; 2, 545–549.

EXPRESSION OF VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR RECEPTORS 1 (VEGFR-1) AND THEIR ROLE IN THE REGULATION OF T CELL PROLIFERATION

© 2019 E. A. Tashkina^{1*}, O. Yu. Leplina¹, E. V. Batorov¹,
A. A. Ostanin¹, N. M. Pasman²

*E-mail: ct_lab@mail.ru

¹Federal Budget Institution of Science «Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology», Novosibirsk, Russia;

²Novosibirsk National Research State University, Novosibirsk, Russia

Received: 15.03.2019. **Accepted:** 02.04.2019

The expression of vascular endothelial growth factor receptors-1 (VEGFR-1) on CD4⁺ and CD8⁺ donor T lymphocytes in mononuclear cell (MNC) cultures, as well as the effect of placental growth factor (PIGF) on T cell proliferation have been investigated. Freshly isolated T cells had low expression of VEGFR-1, which increased during spontaneous cultivation of T cells and most strongly upon activation of T lymphocytes with aCD3 antibodies. The maximum increase in VEGFR-1 – positive CD4⁺ and CD8⁺ T cells is observed at 48 hours. PIGF in a wide dose range inhibits the proliferation of aCD3-stimulated T cells, suppressing CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocyte division to the same extent.

Key words: VEGFR-1, placental growth factor (PIGF), T-lymphocytes

Authors:

Tashkina E. A., ✉ Postgraduate Student, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russia. **E-mail:** ct_lab@mail.ru;

Leplina O. Yu., PhD, MD (Medicine), Leading Research Associate, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russia;

Batorov E. V., PhD (Medicine), Research Associate, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russia;

Ostanin A. A., PhD, MD, Professor (Medicine), Main Research Associate, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russia;

Pasman N. M., PhD, MD, Professor (Medicine), Head of Department of Obstetrics and Gynecology, Novosibirsk National Research State University. Novosibirsk, Russia.

ЭЛЕКТРОПОРАЦИЯ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК ДНК-ПЛАЗМИДОЙ, КОДИРУЮЩЕЙ ИЛ-10

© 2019 г. В. П. Терещенко^{1*}, Ю. Н. Хантакова¹, В. В. Курилин¹,
А. Н. Силков¹, Р. А. Максютков²

*E-mail: tervp@ngs.ru

¹ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной
и клинической иммунологии», Новосибирск, Россия;

²ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», Кольцово, Россия

Поступила: 15.03.2019. Принята: 28.03.2019

На данный момент дендритные клетки (ДК) широко используют для получения вакцин для лечения различных видов заболеваний, таких как злокачественные новообразования, аутоиммунные расстройства, реакция отторжения и РТПХ. Для управления функциональными свойствами ДК их трансфицируют различными иммунорегуляторными белками, в т.ч. ИЛ-10. В данной работе выполнена оптимизация метода электрической трансфекции (электропорации) ДК ДНК-плазмидой, кодирующей ИЛ-10. Эффективность электропорации (ЭП) ДК достигает 45–72% при клеточной смерти ниже 7%. Показана активная экспрессия ИЛ-10 трансфицированными ДК в течение 3 суток после ЭП. По результатам работы ЭП признана эффективным методом для получения трансфицированных ДК для производства клеточных вакцин.

Ключевые слова: дендритные клетки, электропорация, ИЛ-10

DOI: 10.31857/S102872210006533-1

Адрес: 630099 Новосибирск, ул. Ядринцевская, д. 14. ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», Терещенко Валерий Павлович. Тел.: +7 953 906 63 55.

E-mail: tervp@ngs.ru

Авторы:

Терещенко В. П., аспирант лаборатории молекулярной иммунологии НИИФКИ, Новосибирск Россия;

Хантакова Ю. Н., к.м.н., н.с. лаборатории молекулярной иммунологии НИИФКИ, Новосибирск Россия;

Курилин В. В., к.м.н., н.с. лаборатории молекулярной иммунологии НИИФКИ, Новосибирск Россия;

Силков А. Н., д.б.н., с.н.с. лаборатории молекулярной иммунологии, вр.и.о. директора НИИФКИ, Новосибирск Россия;

Максютков Р. А., к.б.н., с.н.с. ГНЦ ВБ «ВЕКТОР», Кольцово, Россия.

ВВЕДЕНИЕ

Дендритные клетки (ДК) обладают способностью к индукции толерантности и подавлению иммунных реакций [1]. Одним из механизмов, который используют ДК для поддержания толерогенного состояния, является продукция ИЛ-10 [2]. ДК, обработанные ИЛ-10, приобретают толерогенный фенотип, индуцируют Трег

и подавляют воспалительные реакции. Кроме того, ИЛ-10 снижает продукцию провоспалительных цитокинов Т-клетками, моноцитами и макрофагами [3] и способствует развитию анергии эффекторных Т-клеток [4]. Таким образом, активная секреция ИЛ-10 дендритными клетками способствует индукции толерантного состояния клеток иммунной системы на антигены и может быть использована для получения дендритно-клеточных вакцин, предназначенных для подавления иммунного ответа, например, при лечении аутоиммунных заболеваний, а также при коррекции реакции отторжения или реакции трансплантат против хозяина (РТПХ).

Для нагрузки ДК различными иммунорегуляторными белками, в т.ч. ИЛ-10, используют методы вирусной, химической, магнитной и электрической трансфекции. Однако, использование первых трех методов предполагает использование искусственных или вирусных частиц, которые требуют дополнительных исследований их безопасности [5]. В связи с этим, использование электрической трансфекции (электропорации), основанной на подаче вы-

соковольтного разряда в суспензию клеток, представляется наиболее перспективным и безопасным подходом для трансфекции экспрессирующих векторов.

Целью данной работы была оптимизация протокола электропорации (ЭП) ДК ДНК-плазмидой, кодирующей ИЛ-10, для их последующего применения в качестве дендритноклеточных вакцин.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали самок мышей линии C57Bl/6, в возрасте от 2 до 6 месяцев. Дендритные клетки получали из клеток костного мозга мышей линии C57Bl/6 в присутствии 20 нг/мл GM-CSF и 20 нг/мл IL-4.

В работе использовались ДНК-плазмиды, кодирующие белок GFP и мышинный ИЛ-10.

Для проведения ЭП к 100 мкл клеток, в концентрации 10–20 млн/мл, добавляли ДНК-плазмиду, и помещали в кювету для ЭП. ЭП клеток осуществлялась на электропораторе ВТХ 830 square-wave в 2 мм кюветах (ВТХ).

Оценка эффективности ЭП проводилась по определению GFP-позитивных клеток на проточном цитофлуориметре BDFacsVersa. Жизнеспособность культуры оценивалась по включению пропидия йодида (PI) в трансфицированные клетки. Для оценки фенотипических показателей культура ДК окрашивалась моноклональными антителами: CD11c-FITC, H2b-PE, CD86-APC-Cy7, CD80-Brilliant Violet 421. Также производили внутриклеточное окрашивание ИЛ-10.

Оценку содержания ИЛ-10 в кондиционных средах культур проводили методом иммуноферментного анализа.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Оптимизация условий электропорации дендритных клеток

Была проведена оценка эффективности ЭП на разных сроках культивирования ДК (0, 3 и 6 сутки). Иммунофенотипирование показало увеличение количества CD11c⁺H2b⁺ дендритных клеток с низким уровнем экспрессии костимуляторных молекул (CD80, CD86) в течение 6 суток. В день 0 клетки костного мозга, несмотря на самую низкую гибель после ЭП (3,29%), менее всего подвергаются процедуре трансфекции в сравнении с ДК на 3 и 6 день культивирования (клеток позитивных по GFP – 12,99% против 32,17% и 27,62%, соответственно). Кроме того,

к 6 суткам достоверно увеличивается гибель клеток после проведенной ЭП (10,95%) в сравнении с ДК на 3 сутки (5,005%).

Для определения оптимальной концентрации клеток для ЭП, было проведено сравнение эффективности трансфекции и жизнеспособности 6-суточных ДК. Результаты не выявили зависимости эффективности трансфекции и клеточной гибели от концентрации клеток.

Так же было протестировано несколько вариантов сред для использования после процедуры электропорации. Показано, что изолированное добавление цитокинов (ГМ-КСФ и ИЛ-4) или ЛПС к свежей среде для культивирования после электропорации не влияет на относительное количество клеток и эффективность электропорации. При использовании кондиционной среды совместно с цитокинами наблюдается увеличение количества целевых клеток на 25% (с 35% до 44%), по сравнению с другими вариантами культивирования. При всех исследованных вариантах культивирования, наблюдаемая гибель клеток после электропорации была в пределах 7% и значимо не различалась между группами.

Экспрессия ИЛ-10 трансфицированными клетками

Анализ внутриклеточного содержания ИЛ-10 показал, что спустя 3 часа после ЭП ДК ДНК-плазмидой, кодирующей ИЛ-10, наблюдается двукратное увеличение количества IL-10-продуцирующих CD11c⁺ ДК по сравнению с контрольной группой (36,6% против 19,6%). Спустя 24 часа после электропорации, сохраняется разница между трансфицированными и контрольными группами по количеству ИЛ-10-продуцирующих CD11c⁺ клеток (9,4% против 2,3%).

Методом ИФА показана дозозависимая продукция ИЛ-10 в культуральную среду. Так, по сравнению с ДК без ЭП, которые продуцируют IL-10 в очень низких концентрациях (4 пг/мл), даже минимальное количество плазмидной ДНК (1 мкг/мл) способствует увеличению продукции IL-10 в 220 раз (до 896 пг/мл), а использование больших концентраций плазмиды приводит к гиперпродукции ИЛ-10 до 45 нг/мл. В течение 3 дней после ЭП концентрация ИЛ-10 оставалась неизменной.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Данное исследование выполнялось с целью оптимизации условий трансфекции клеток моноцитарного происхождения плазмидными

конструкциями для модуляции собственной биологической активности. Установлено, что электropорация является эффективным способом трансфекции ИЛ-10 в ДК и может быть использована для дальнейшего получения дендритно-клеточных вакцин.

Работа выполнена в рамках проекта РНФ 16-15-00086.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Legge K. L., Gregg R. K., Maldonado-Lopez R., Li L., Caprio J. C., Moser M., Moser M., Zaghouni H. (2002) On the role of dendritic cells in peripheral T cell tolerance and modulation of autoimmunity. *J Exp Med* 196: 217–227.
2. Akbari O., DeKruyff R. H. & Umetsu D. T. Pulmonary dendritic cells producing IL-10 mediate tolerance induced by respiratory exposure to antigen. (2001) *Nature Immunol* 2: 725–731.
3. Fiorentino D. F., Zlotnik A., Mosmann T. R., Howard M. & O'Garra A. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J Immunol.* 147, 3815–3822 (1991).
4. Roncarolo M. G., and Battaglia, M. (2007). Regulatory T-cell immunotherapy for tolerance to self antigens and alloantigens in humans. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 585–598.
5. Yin H., Kanasty R. L., Eltoukhy A. A., Vegas A. J., Dorkin J. R., Anderson D. G. Non-viral vectors for gene-based therapy. *Nat Rev Genet.* 2014 Aug;15(8):541–55.

DENDRITIC CELLS ELECTROPORATION WITH DNA-PLASMID ENCODING IL-10

© 2019 V. P. Tereshchenko^{1*}, J. N. Khantakova^{1,2}, V. V. Kurilin¹, A. N. Silkov¹, R. A. Maksyutov³

*E-mail: tervp@ngs.ru

¹FSBSI Research institute of fundamental and clinical immunology, Novosibirsk, Russia;

²SRC of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo, Russia

Received: 15.03.2019. Accepted: 28.03.2019

Dendritic cells (DC) are widely used to produce vaccines for the treatment of various types of diseases, such as malignant neoplasms, autoimmune disorders, rejection and GVHD. To control the functional properties of DCs, they are transfected with various immunoregulatory proteins, including IL-10. In this paper, the optimization of the method of electrical transfection (electroporation) of DCs with a DNA plasmid encoding IL-10 was performed. The efficiency of DC electroporation (EP) reaches 45–72% with cell death below 7%. The active expression of IL-10 in transfected DC was shown within 3 days after EP. According to the results of the work, EP was recognized as an effective method for obtaining transfected DCs for the production of cellular vaccines.

Key words: dendritic cells, electroporation, IL-10

Authors:

Tereshchenko V. P., ✉ Ph.D student in laboratory of molecular immunology RIFCI, Novosibirsk, Russia. **E-mail:** tervp@ngs.ru;

Khantakova J. N., Ph.D, researcher in laboratory of molecular immunology RIFCI, Novosibirsk, Russia;

Kurilin V. V., Ph.D, researcher in laboratory of molecular immunology RIFCI, Novosibirsk, Russia;

Silkov A. N., Ph.D, researcher in laboratory of molecular immunology, head of RIFCI, Novosibirsk, Russia;

Maksyutov R. A., Ph.D, researcher in State Research Center of Virology and Biotechnology, Koltsovo, Russia.

ИНТЕРНЕТ-ЗАВИСИМОСТЬ У ПОДРОСТКОВ ЦЕНТРАЛЬНОЙ СИБИРИ

© 2019 г. С. Ю. Терещенко, М. В. Смольникова*

*E-mail: smarinv@yandex.ru

Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера
ФИЦ КНЦ СО РАН, Красноярск, Россия

Поступила: 15.03.2019. Принята: 26.03.2019

Патологическая интернет-зависимость относится к группе мультифакториальных полигенных заболеваний, где в каждом конкретном случае имеет место уникальное сочетанное влияние врожденных особенностей функционирования высшей нервной деятельности, часть из которых генетически детерминирована с влиянием множества внешнесредовых факторов. В этой связи, одной из важнейших фундаментальных задач является выявление конкретных генов и нейромедиаторных ассоциаций, отвечающих за предрасположенность к формированию интернет-зависимости у подростков, что позволит выйти на поиск новых терапевтических мишеней и путей ранней профилактики с оценкой степени генетического риска.

Ключевые слова: интернет-зависимость, подростки, генетическая детерминированность

DOI: 10.31857/S102872210006532-0

Адрес: 660022 Красноярск, ул. П. Железняк 3г, НИИ медицинских проблем Севера ФИЦ КНЦ СО РАН, Смольникова Марина Викторовна, Тел./факс: +7 (391) 228-06-81, E-mail: smarinv@yandex.ru

Авторы:

Терещенко С. Ю., д.м.н., профессор, заведующий клиническим отделением соматического и психического здоровья детей Научно-исследовательского института медицинских проблем Севера ФИЦ КНЦ СО РАН; Красноярск, Россия;
Смольникова М. В., к.б.н., ведущий научный сотрудник Научно-исследовательского института медицинских проблем Севера ФИЦ КНЦ СО РАН; Красноярск, Россия.

АКТУАЛЬНОСТЬ

Анализ этногеографических различий интернет-зависимости с одновременным учетом этнических различий в распространенности генотипических особенностей популяций представляется актуальным и в достаточной мере не исследованным направлением современной нейрогенетики аддикций у подростков, особенно в такой многонациональной стране, как Россия. Целый ряд нейромедиаторов может быть вовлечен в нейробиологические механизмы формирования интернет-зависимости (ИЗ) у подростков, среди них: Окситоцин (принимает участие в патогенезе суицидального и агрессивного поведения), Меланокортин (играет роль в фор-

мировании патологических аддикций у подростков), бета-Эндорфин (рассматривается как маркер адаптации к стрессорным воздействиям и эффективности терапии депрессии), Нейротензин (вовлечен в модуляцию допаминового сигналинга и формирование патологических аддикций), Орексин (вовлечен в формирование нарушений сна и формирование аддиктивного поведения), Субстанция Р (продукция ассоциирована с формированием многих типов патологических аддикций).

Наличие генетического компонента формирования ИЗ было показано близнецовыми исследованиями на примере различных популяций, однако к настоящему времени конкретные гены, вовлеченные в механизмы такой наследуемости, точно не идентифицированы. Ранее были верифицированы полиморфные участки пяти кандидатных генов, среди них: rs1800497 (dopamine D2 receptor (DRD2) gene) и rs4680 (COMT) gene), их аллельные варианты ассоциированы с предрасположенностью к алкоголизму, азартным играм и синдрому дефицита внимания с гиперактивностью; rs25531 (serotonin transporter (SS-5HTTLPR) gene), аллельные варианты этого гена ассоциированы с патологической интернет-зависимостью и с предраспо-

ложенностью к депрессии; rs1044396 (nicotinic acetylcholine receptor subunit alpha 4 (CHRNA4) gene), генотип *CC ассоциирован с никотиновой зависимостью и расстройствами внимания; rs2229910 (neurotrophic tyrosinekinase receptor type 3 (NTRK3) gene), ассоциирован с тревожно-паническими, депрессивными расстройствами, психологически детерминированными расстройствами питания [1–3]. В результате представленной работы ожидается подтверждение гипотезы о генетически детерминированном нарушении функции допамин- и серотонинергической нейромедиаторных систем формирования интернет-зависимости.

Цель работы – изучить распространенность различных по степени выраженности, паттерну аддикции и контенту вариантов интернет-зависимости у подростков крупных, этнически различающихся городов Центральной Сибири с целью дальнейшего исследования ассоциативной роли кандидатных нейромедиаторов в формировании ИЗ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Обследован 131 подросток европеоидного происхождения в возрасте 13–18 лет (средний возраст $15,3 \pm 1,6$). Среди них 66 девочек и 65 мальчиков. Все обследованные или их родители дали письменное информированное согласие на участие в исследовании. Первым этапом исследования была оценка общей частоты встречаемости интернет-зависимости у подростков 13–18 лет, проживающих в г. Красноярске, с помощью «Теста Интернет-зависимости Чена (Chen Internet addiction Scale – CIAS, S.-H. Chen, 2003) в адаптации В.Л. Малыгина, К.А. Феклисова» [4, 5] в случайно отобранных общеобразовательных школах. Тест позволяет параллельно измерять специфические симптомы зависимости, среди которых: толерантность, симптом отмены, компульсивность и исключительно психологические аспекты, такие как, способность управлять собственным временем и наличие внутриличностных проблем.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результатом анализа контент-структуры интернет-зависимости у подростков г. Красноярска стало выделение трех групп подростков: (1) подростки с отсутствием интернет-зависимого поведения, группа контроля (ожидаемая частота 60–75%); выявленная частота – 61,8%; (2)

подростки со склонностью к возникновению интернет-зависимого поведения/доаддиктивный этап (ожидаемая частота 20–30%); выявленная частота – 32,8%; (3) подростки с наличием интернет-зависимого поведения/поведения с компонентом злоупотребления интернетом (ожидаемая частота 5–10%); выявленная частота – 5,4%. Обращает на себя внимание, что количество девочек в группе 2 составило 37,9% по сравнению с 27,7% среди мальчиков.

В результате анализа были выделены 7 интернет-зависимых подростков, к которым подобраны пары (соответствующие по полу, возрасту и национальности) для забора биологического материала, дальнейшего выделения ДНК и проведения генетического скрининга полиморфных генов подверженности к ИЗ.

Поданным литературы, методологически выверенное исследование учащихся 9–11 классов г. Москвы с использованием валидизированного авторами вопросника CIAS, показало, что «из всех обследованных подростков (n=190) 11.0% имеют признаки интернет-зависимости, 42.0% злоупотребляют Интернетом». Другое исследование этой же исследовательской группы показало, что «из 1084 подростков (средний возраст по выборке – 15.56) 4.25% были диагностированы как интернет-зависимые и 29.33% как злоупотребляющие Интернетом» [4]. Из 120 протестированных студентов г. Санкт-Петербурга (шкала CIAS) у 50% человек были выявлены признаки компьютерной зависимости.

Нами проведено тестовое генотипирование выборки европеоидов г. Красноярска (n=302) полиморфного участка rs2229910 NTRK3 gene. Получены частоты распределения генотипов: *CC 37,4%, *CG 46,0%, *GG 16,6%. В результате увеличения группы ИЗ подростков планируется провести сравнительный анализ распределения полиморфных участков rs2229910 и rs1800497, rs4680, rs25531, rs1044396 у подростков различных городов Центральной Сибири с целью выявления генов-кандидатов формирования интернет-зависимости.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-29-22032\18.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Han D. H., Lee Y. S., Yang K. C., Kim E. Y., Lyoo I. K., Renshaw P. F. Dopamine genes and reward dependence in adolescents with excessive internet video game play. *J Addict Med*, 2007, 1(3), 133–138.

2. Jeong J. E., Rhee J. K., Kim T. M., Kwak S. M., Bang S. H., Cho H., Cheon Y. H., Min J. A., Yoo G. S., Kim K., Choi J. S., Choi S. W., Kim D. J. The association between the nicotinic acetylcholine receptor alpha4 subunit gene (CHRNA4) rs1044396 and Internet gaming disorder in Korean male adults. *PLoS ONE*, 2017, 12(12), e0188358.
3. Montag C., Kirsch P., Sauer C., Markett S., Reuter M. The role of the CHRNA4 gene in Internet addiction: a case-control study. *J Addict Med*, 2012, 6(3), 191–195.
4. Малыгин В. Л., Меркурьева Ю. А., Искандирова А. Б., Пахтусова Е. Е., Прокофьева А. В. Особенности ценностных ориентаций у подростков с интернет-зависимым поведением. *Медицинская психология в России*, 2015, 33(4), 1–20. [Malygin V. L., Merkurieva Yu. A., Iskandirova A. B., Pakhtusova E. E., Prokofyeva A. V. Peculiarities of value orientations in adolescents with Internet-dependent behavior. *Medical psychology in Russia*, 2015, 33(4), 1–20].
5. Chen S.-H., Weng L.-J., Su Y.-J., Wu H.-M., Yang P.-F. Development of a Chinese Internet Addiction Scale and Its Psychometric Study. *Chinese Journal of Psychology*, 2003, 45(3), 279–294.

INTERNET DEPENDENCE IN ADOLESCENTS OF CENTRAL SIBERIA

© 2019 S. Y. Tereshchenko, M. V. Smolnikova*

*E-mail: smarinv@yandex.ru

*Scientific Research Institute of Medical Problems of the North
FRC KSC SB RAS, Krasnoyarsk, Russia*

Received: 15.03.2019. **Accepted:** 26.03.2019

Pathological Internet addiction belongs to the group of multifactorial polygenic diseases, where in each case there is a unique combined effect of the innate features of the functioning of higher nervous activity, some of which are genetically determined with the influence of many environmental factors. In this regard, one of the most important fundamental tasks is the identification of specific genes and neurotransmitter associations responsible for the propensity to form Internet addiction in adolescents, which will lead to a search for new therapeutic targets and ways of early prevention with an assessment of the degree of genetic risk.

Key words: Internet addiction, adolescents, genetic determinism

Authors:

Tereshchenko S. Y., DM, Professor, Head of the Clinical Department of Somatic and Mental Health of Children, Scientific Research Institute of Medical Problems of the North FRC KSC SB RAS; Krasnoyarsk, Russia;

Smolnikova M. V., ✉ PhD, Leading researcher, Scientific Research Institute of Medical Problems of the North FRC KSC SB RAS; Krasnoyarsk, Russia. **E-mail:** smarinv@yandex.ru

ОПРЕДЕЛЕНИЕ УРОВНЯ ММР 2, ТИМР 2 И ИХ СООТНОШЕНИЯ У ПАЦИЕНТОВ С ОСТРЫМ ПОВРЕЖДЕНИЕМ ПОЧЕК (ОПП) ДО И ПОСЛЕ АОРТОКОРОНАРНОГО ШУНТИРОВАНИЯ (АКШ)

© 2019 г. В. Г. Фисенко*, О. И. Фомина, П. Н. Боярская, А. Л. Пашенко, Е. А. Чагина

*E-mail: fishmendoc@mail.ru

ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет»
Минздрава РФ, Владивосток, Россия

Поступила: 14.03.2019. Принята: 28.03.2019

Изучен уровень ММР-2, ТИМР-2 и их соотношения в сыворотке крови с целью выявления предикторов тяжелого течения ОПП для начала проведения ранней заместительной почечной терапии после АКШ. В исследовании приняли участие 60 пациентов с ИБС обоего пола от 45 до 74 лет до и после АКШ. Выявлены статистически значимые различия ММР-2, ТИМР-2 и их соотношения в сыворотке крови у пациентов с ОПП до и после АКШ разных групп. Динамика индекса соотношения ММР-2/ТИМР-2 в двух сравниваемых группах больных с ОПП была разной. У пациентов I группы в первые сутки после АКШ показатель достоверно снижался, с последующим существенным нарастанием на 2-е и высокими значениями к 7-м суткам после АКШ. У пациентов II группы определена волнообразная динамика ММР-2/ТИМР-2: повышение в первые сутки, значимое снижение на 2-е и двукратное увеличение на 7-е сутки. У пациентов с ХБП установлена диагностическая и прогностическая значимость уровня ММР-2 на всех этапах мониторинга.

Ключевые слова: АКШ, ОПП, биомаркеры, ММР-2, ТИМР-2

DOI: 10.31857/S102872210006507-2

Адрес: г. Владивосток. 690002, проспект Острякова, д. 4. ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, Кафедра нормальной и патологической физиологии. Фисенко Василий Геннадьевич. Тел./факс: 8 914 790 19 85 (моб.).

E-mail: fishmendoc@mail.ru

Авторы:

Фисенко В. Г., ассистент кафедры нормальной и патологической физиологии, ФГБОУ ВО ТГМУ Минздрава России, Владивосток, Россия;

Фомина О. И., ассистент кафедры нормальной и патологической физиологии, ФГБОУ ВО ТГМУ Минздрава России, Владивосток, Россия;

Боярская П. Н., студентка 3 курса лечебного факультета, ФГБОУ ВО ТГМУ Минздрава России, Владивосток, Россия;

Пашенко А. Л., студентка 3 курса лечебного факультета, ФГБОУ ВО ТГМУ Минздрава России, Владивосток, Россия;

Чагина Е. А., к. м. н., доцент кафедры нормальной и патологической физиологии, ФГБОУ ВО ТГМУ Минздрава России, Владивосток.

Острое почечное повреждение является самым частым, после сепсиса, осложнением при

проведении АКШ у кардиохирургических больных. Быстрое восстановление функции почек улучшает общее состояние больного и прогноз на дальнейшее полное выздоровление, уменьшает риск летального исхода. Для ранней диагностики ОПП внедряется большое количество биомаркеров, такие как цистатин С, липокалин (NGAL), интерлейкин-18, молекула-1 повреждения почек (KIM 1), β 2-микроглобулин, кластерин, матриксные металлопротеиназы и их ингибиторы [1]. Но не все биомаркеры изучены полностью. Существует большое количество спорных вопросов. Одним из них является вопрос об изменении уровня таких маркерах как ММР-2, ТИМР-2 и их соотношения. ММР-2 относится к семейству внеклеточных цинк-зависимых эндопептидаз, способных разрушать все типы белков внеклеточного матрикса [2, 3]. Его роль велика как в физиологических, так и в патологических процессах. ТИМР-2 ингиби-

рует все типы ММР, но особенно специфичен в отношении ММР-2. Однако, данные изменений уровней ММР-2, ТИМР-2 и их соотношения у пациентов с нарушением функции почек после АКШ, а также их диагностический характер при ОПП расходятся.

Цель исследования. Выявить роль нарушений ММР-2 и ТИМР-2 и их соотношения в развитии и неблагоприятном прогнозе ОПП у пациентов с ишемической болезнью, перенесших операцию АКШ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Определение уровня ММР-2, ТИМР-2 в сыворотке крови проведено методом ИФА у 60 пациентов с ИБС, обоюго пола от 45 до 74 лет до и после АКШ. Рассчитано соотношение ММР-2/ТИМР-2. Пациенты были разделены на 3 группы по 20 человек: без ОПП и без ХБП (группа контроля), с ОПП без ХБП (I группа), с ОПП с ХБП (II группа). Биологический материал забирался на 1-е сутки до и после операции, на 2-е и 7-е сутки после операции. Статистический анализ проводился непараметрическими методами. Результаты выражены в нг/мл.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Уровень креатинина сыворотки в I и особенно во II группе до операции существенно (в 1,5–2,5 раза) превышал показатели контрольной группы. На 2-е, 7-е сутки после оперативного вмешательства показатель статистически значимо увеличивался. Отмечены высокие значения ММР-2 в сыворотке крови у пациентов II группы с ХБП и с ОПП как до операции, так и в первые сутки после оперативного вмешательства с существенным нарастанием на 7 день ($p < 0,001$). В I группе пациентов с ОПП без ХБП наблюдалось увеличение ММР-2 на вторые сутки после АКШ. Выявлены различия в динамике концентрации ММР 2 у пациентов I и II группы в первые и на 2 и 7 сутки после оперативного вмешательства. В I группе пациентов с ОПП без ХБП выявлено достоверное ($p < 0,05$) увеличение показателя ТИМР 2 на 25% в первые сутки, после операции с последующим снижением его содержания, особенно на

7 сутки 81,02 (56,78; 120,31) нг/мл против 122,89 (104,48; 142,47) нг/мл в контроле ($p < 0,01$). У пациентов II группы ТИМР 2 в основные сроки мониторинга мало отличался от контроля ($p > 0,05$), снижаясь на 7 сутки. При расчете соотношения ММР-2/ТИМР-2 в трех группах до операции существенных различий не выявлено. В контрольной группе наблюдалось снижение показателя в 1-е и на 2-е и 7-е сутки после оперативного вмешательства ($p < 0,05$).

ВЫВОДЫ

Выявлены статистически значимые различия ММР-2, ТИМР-2 и их соотношения в сыворотке крови у пациентов с ОПП до и после АКШ разных групп. Определение соотношения двух маркеров структурного повреждения почек (ММР-2, ТИМР-2) у пациентов на 2-е сутки после АКШ позволяет диагностировать ОПП. Динамика индекса соотношения ММР-2/ТИМР-2 в двух сравниваемых группах больных с ОПП была разной. У пациентов I группы в первые сутки после АКШ показатель достоверно снижался, с последующим существенным нарастанием на 2-е и высокими значениями к 7-м суткам после АКШ. У пациентов II группы определена волнообразная динамика ММР-2/ТИМР-2 с повышением в первые сутки, значимым снижением на 2-е и двукратным увеличением на 7-е сутки. У пациентов с ХБП зафиксирована диагностическая и прогностическая значимость уровня ММР-2 на всех этапах мониторинга.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Chiara Levante. Routine adoption of TIMP 2 and IGFBP7 biomarkers in cardiac surgery for early identification of acute kidney injury // Int Journal Artif Organs. – 2017. – V.40 (12). – P. 714–718.
2. Уразаева Л. И., Максудова А. Н. Биомаркеры раннего повреждения почек: обзор литературы // Практическая медицина. – 2014. – Т. 4.(80). – С. 125–130. [Urazaeva L. I., Maksudova A. N. Biomarkers of acute injury of the kidneys: the review. // Practical Medicine. 2014; 4(80): 125–130.]
3. Борисов А. Ю. Ранняя диагностика острого почечного повреждения // Клиническая и профилактическая медицина. – 2016. – Т. 9 № 1. – С. 467–480. [Borisov A. U. Early diagnosis of acute injury of the kidneys // Profclinmed. 2016; 9 (1): 467–480.]

THE DETERMINATION OF MMP-2, TIMP-2 LEVELS AND ITS RATIO IN BLOOD SERUM IN PATIENTS WITH AKI BEFORE END AFTER CORONARY ARTERY BYPASS GRAFTING

© 2019 Fisenko V. G. *, Fomina O. I., Boyarskaya P. N.,
Paschenko A. L., Chagina E. A.

*E-mail: fishmendoc@mail.ru

FSBEI of Higher Education "Pasific State Medical University"
MOH of the Russian Federation, Vladivostok, Russia

Received: 14.03.2019. Accepted: 28.03.2019

The levels of MMP-2, TIMP-2 and its ratio in blood serum were studied in order to identify predictors of severe AKI for initiating early renal replacement therapy after CABG. The study engaged 60 patients, from 45 to 74 years old, with CHD before and after CABG without diabetes mellitus. Statistically significant differences of MMP-2, TIMP-2 and its ratio in the blood serum were revealed. Determining the ratio of two structural kidney damage markers (MMP-2, TIMP-2) in patients on the 2nd day after CABG allows to detect AKI. The dynamics of the MMP-2 / TIMP-2 ratio in the two compared groups with AKI was different. In the 1st group, the value of ratio significantly decreased on the first day after CABG, significantly increased on the 2nd and reached high rates on the 7th day. In the 2nd group, there was a wave dynamics of MMP-2 / TIMP-2 ratio: increase on the first day, a significant decrease on the 2nd and a twofold increase on the 7th day. Diagnostic and prognostic significance of the MMP-2 level was found in patients with CKD at all steps of monitoring.

Key words: CABG, AKI, biomarkers, MMP-2, TIMP-2

Authors:

Fisenko V. G., ✉ assistant of normal and pathologic physiology department, FSBEI of Higher Education "Pasific State Medical University" MOH of the Russian Federation, Vladivostok, Russia. **E-mail:** fishmendoc@mail.ru;

Fomina O. I., assistant of normal and pathologic physiology department, FSBEI of Higher Education "Pasific State Medical University" MOH of the Russian Federation, Vladivostok, Russia,

Boyarskaya P. N., student of the 3rd year, General Medicine Faculty, FSBEI of Higher Education "Pasific State Medical University" MOH of the Russian Federation, Vladivostok, Russia,

Paschenko A. L., student of the 3rd year, General Medicine Faculty, FSBEI of Higher Education "Pasific State Medical University" MOH of the Russian Federation, Vladivostok, Russia,

Chagina E. A., candidate of medical science, assistant professor of normal and pathologic physiology department, FSBEI of Higher Education "Pasific State Medical University" MOH of the Russian Federation, Vladivostok, Russia.

ИММУНОЭНДОКРИННЫЕ И ПСИХОЛОГИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ АДАПТАЦИИ ВО ВНОВЬ СФОРМИРОВАННОМ КОЛЛЕКТИВЕ

© 2019 г. Т. А. Фишер^{1*}, С. А. Петров¹, И. В. Фишер²

*E-mail: fitan72@mail.ru

¹ФГБУН ФИЦ «ТюмНЦ СО РАН», Тюмень, Россия;

²ФГКОУ ДПО «Тюменский институт повышения квалификации сотрудников
МВД России», Тюмень, Россия

Поступила: 11.02.2019. Принята: 26.02.2019

Приводится обоснование новых методологических подходов изучения адаптационных механизмов с точки зрения функциональной сопряженности психоиммуноэндокринных параметров в контексте этапов специфического иммунного ответа.

Ключевые слова: иммунная система, эндокринная система, новый коллектив, психика

DOI: 10.31857/S102872210006506-1

Адрес: 625027, Тюмень, ул. Котовского, 5. ООО «Тюменский филиал института клинической иммунологии», Фишер Татьяна Александровна. Тел.: +79199260582 (моб.).

E-mail: fitan72@mail.ru

Авторы:

Фишер Т. А., к. б. н., с. н. с. «Тюменского научного центра» СО РАН, Тюмень, Россия;

Петров С. А. д. м. н., профессор, руководитель отдела биоресурсов криосферы «Тюменского научного центра» СО РАН, Тюмень, Россия;

Фишер И. В., старший преподаватель кафедры огневой, тактико-специальной подготовки и оперативного планирования ФГКОУ ДПО «Тюменский институт повышения квалификации сотрудников МВД России», Тюмень, Россия.

АКТУАЛЬНОСТЬ

Все чаще рассматривается соотношение иммунного и психологического на разных уровнях биологической организации в онтогенезе человека. Для запуска защитных реакций на антиген описаны фазы иммунного ответа [1]. Для запуска защитных реакций со стороны психики – стадии стресса [2]. Если следовать одной установке в течение 21 дня, то вырабатывается привычка, которая со временем формируется в потребность [3]. Теория о 21-м дне достаточно спорная, и многие её подвергают сомнению, но если эту теорию рассматривать в призме психоиммунологической взаимосвязи, то у этой теории появляется физиологическая основа. Особенно это актуально при прохождении профессиональ-

ного обучения у сотрудников силовых структур. В связи с этим **целью** явилось – показать сопряженность функционирования иммуноэндокринных и психологических взаимодействий при формировании временного коллектива сотрудников ОВД.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Обследованы 59 сотрудников патрульно-постовой службы, которые прибыли на новое место службы с целью профессионального обучения. За основу исследования взяты фазы иммунного ответа. *1-я фаза выработки антител* длится от нескольких минут и часов и характеризуется началом экспоненциального прироста антител, быстрым ответом врожденного неспецифического иммунитета на антиген с активацией факторов естественной резистентности; *2-я фаза выработки антител* длится от 2 до 4 дней, характеризуется экспоненциальным приростом антител и индукцией специфического иммунитета с включением клеточных факторов раннего индуцибельного ответа; *3-я фаза выработки антител* продолжается в течение нескольких дней, недель. Определяется как фаза стабилизации, в течение которой титр антител остается стабильно высоким и переключением синтеза антител с одного изотипа (IgM) на другой (IgG); *4-я фаза снижения продукции антител* возрас-

тает уровень клеток иммунологической памяти к данному антигену. В соответствии с фазами иммунного ответа проведены четыре забора крови на 1, 4, 14 и 21 сутки после пребывания на новое место службы (учебы) и определены психосоциальные характеристики, приближенные к теории стресса по Г. Селье. *Стадия тревоги* (1 сутки) – ориентировочная основа действия, что связано с началом поисковой активности; *стадия резистентности* (4 сутки) – совладание со стрессами – включение копинговых стратегий; *стадия эустресса или дистресса* (14 сутки) – в данном случае стабилизация энергетических ресурсов или возвращение к фоновому состоянию (*гомеостатическое равновесие*); 21 сутки, характеризуется формированием нового опыта (привычек, установок), что эквивалентно «*завершенной адаптации*». Методом ИФА оценивались ИЛ-4, ИНФ- γ , серотонин и кортизол. Тестами: Люшера, САН и «Социально-психологический климат» оценивалось психосоциальное состояние. Статистическая обработка: программа: SPSS11,5 (t-критерий Стьюдента, корреляция Пирсона).

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

По тесту Люшера, установлено, что в течение 21 суток у сотрудников ОВД наблюдалась оптимальная мобилизация физических и психических ресурсов с установкой на продуктивную деятельность («вегетативный коэффициент») и улучшалось непродуктивное нервно-психическое напряжение («суммарное отклонение» $p < 0,05$). По тесту САН за весь период наблюдения показатели «самочувствие», «активность» и «настроение» остаются стабильно высокими. Социально-психологический климат в коллективе на 21 сутки значительно улучшился ($p < 0,05$). Рассматривая иммуноэндокринные характеристики, установлено, превышение содержания кортизола в сравнении с референтными значениями за все время наблюдения ($p < 0,001$). Отмечены корреляционные связи уровня кортизола: на 4-е сутки с показателями «настроение» ($r = 0,327$ при $p < 0,05$); на 21-е сутки с показателями «активность» ($r = -0,673$ при $p < 0,05$) и «самочувствие» ($r = -0,469$ при $p < 0,05$). Уровень серотонина не выходил за пределы физиологической нормы, но отмечены следующие корреляции: «активность» (в 1-е сутки $r = 0,405$ при $p < 0,05$, 4-е сутки $r = 0,519$ при $p < 0,05$ и 21-е сутки $r = 0,446$ при $p < 0,05$), «самочувствие» ($r = 0,375$ при $p < 0,05$), «вегетативный коэффициент» ($r = -0,313$ при

$p < 0,05$) и «суммарное отклонение» ($r = 0,440$ при $p < 0,05$). ИЛ-4 восстанавливается к 21-м суткам до уровня контроля ($p < 0,001$). Корреляции ИЛ-4: с показателями «суммарное отклонение» (1-е сутки $r = -0,338$ при $p < 0,05$ и 21-е сутки $r = 0,507$ при $p < 0,05$) и «активность» ($r = 0,744$, при $p < 0,001$). Отмечено волнообразное течение уровня ИНФ- γ : к 4-м суткам происходит резкое снижение ($p < 0,001$), после этого к 14 суткам наблюдается увеличение ($p < 0,05$) и к 21-м суткам восстановление до исходного уровня.

КРАТКОЕ ОБСУЖДЕНИЕ

Прослежена динамика функционирования иммунной системы в рамках общепринятой этапности специфического иммунного ответа. Установлено, что иммунная система «откликается» на измененные условия существования в рамках формирования нового коллектива как на инфекционный антиген, запуская Т-клеточную реакцию иммунного ответа, которая осуществляется при участии Th1 и Th2 лимфоцитов. Это ещё раз подтверждает существование единого механизма реакций на неблагоприятное воздействие, в котором заложен глубокий биологический смысл. Поскольку угрожающие воздействия настолько разнообразны, что не может быть готовых программ для выживания и приспособления к любым условиям, поэтому в процессе эволюции выработался единый механизм, который не адаптируется сам, но создаёт основу (метаболическую, функциональную, структурную) для самых разнообразных адаптаций. В этом заключается сопряженность функционирования психики, иммунной и эндокринной систем. И даже несмотря на то, что эти системы изолированы (автономны) по отношению друг к другу, они все же работают синхронно и влияют друг на друга. Очевидно, что эти системы не является суммой отдельных составных частей, а составляют единый «структурно-информационный образ», как единое целое [4].

Работа выполнена по гос. заданию. Программа IX.133.1. Проект: IX.133.1.4.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Клиническая иммунология и аллергология: В 3 т., под ред. Л. Йегера, М.: Медицина, 1986. [Clinical immunology and allergology: In 3 vol., ed. L. Yeager, M.: The Medicine, 1986]
2. Селье Г. Очерки об адаптационном синдроме. М.: Медгиз, 1960, 254 с. [Selye H. The Story of the adaptation syndrome. Montreal, Med. publ., 254].

3. Мухрякова И. В., Симонова Н. Н. Адаптивные стратегии профессионалов при вахтовом труде в условиях Крайнего Севера. «Психология и современный мир», материалы научной конференции с международным участием, 26 апреля 2012 г., Архангельск: КИРА, Вып. 5, Ч. 1, 179–181. [Mukhryakova I. V., Simonova N. N. Adaptive strategies of professionals at rotational work in the conditions of the Far North. “Psychology and the modern world”, conference materials with international participation, April 26, 2012, Arkhangelsk: KIRA, 5, 1, 179–181].
4. Suhovey Yu. G., Koptuyug A. V., Petrov S. A., Dotsenko E. L., Fisher T. A. Psycho-immune partnership in the dynamic responses of living systems. International Journal of Life Science and Medical Research 2014, 4, 5, 57–70.

IMMUNE-ENDOCRINE AND PSYCHOLOGICAL MECHANISMS OF ADAPTATION AGAIN A FORMED COLLECTIVE

© 2019 T. A. Fisher^{1*}, S. A. Petrov¹, I. V. Fisher²

*E-mail: fitan72@mail.ru

¹Tyumen Scientific Centre SB RAS, Tyumen, Russia;

²FGKOU DPO “Tyumen Institute for Advanced Studies of the Staff of the Ministry of Internal Affairs of Russia”, Tyumen, Russia

Received: 11.02.2019. **Accepted:** 26.02.2019

The article provides the rationale for new methodological approaches to the study of adaptation mechanisms in terms of functional conjugacy of psycho-immune-endocrine parameters in the context of the stages of a specific immune response.

Key words: immune system, endocrine system, new living conditions, new team, psyche

Authors:

Fisher T. A., ☒ PhD, Senior Researcher of the Department of Bioresources Cryosphere, Tyumen Scientific Centre SB RAS, Tyumen, Russia. **E-mail:** fitan72@mail.ru;

Petrov S. A., MD, Professor, Head of the Bioresources Department of the Cryosphere “Tyumen Research Center” SB RAS, Tyumen, Russia;

Fisher I. V., Senior Lecturer, Department of Fire, Tactical and Special Training and Operational Planning, FSEI DPO “Tyumen Institute for Advanced Studies of the Staff of the Ministry of Internal Affairs of Russia”, Tyumen, Russia.

ИММУНОРЕГУЛЯТОРНЫЕ СВОЙСТВА И ПРОРЕГЕНЕРАТИВНОЕ ДЕЙСТВИЕ МИКРОВЕЗИКУЛ (МВ), ПРОДУЦИРУЕМЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫМИ СТВОЛОВЫМИ КЛЕТКАМИ (МСК) В МОДЕЛИ ОСТРОЙ ПОЧЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ (ОПН) МЫШЕЙ

© 2019 г. Т. С. Хабалова*, Э. А. Кашенко, Г. В. Селедцова

*E-mail: khabalovat@gmail.com

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной
и клинической иммунологии», Новосибирск, Россия

Поступила: 14.03.2019. Принята: 29.03.2019

Целью работы стало изучить иммунорегуляторные свойства МВ, продуцируемых МСК и их вклад в прорегенераторное действие МВ на почечную ткань. Эксперименты проведены на линейных мышцах C57Bl6 возрастом 3–4 месяца. Острую почечную недостаточность (ОПН) индуцировали однократным введением 50% глицерола. Мезенхимальные стволовые клетки получали из костного мозга здоровых животных, культивировали в стандартных условиях. Микровезикулы (МВ) получали путем центрифугирования при 10000 g супернатанта МСК после индукции апоптоза путем культивирования в условиях депривации кислорода и в бессывороточной среде в течение суток. Показано, что МВ оказывают положительный эффект на восстановление выделительной функции почек на уровне, сопоставимом с эффектом, оказываемым МСК. Использование МСК и МВ в лечении ОПН приводило практически к одинаковому результату: на 4-е сутки уровень мочевины составил 9,3 мг/мл и 9,37 мг/мл соответственно, что на 25% ниже, чем в глицерол-контроле. К 8-м суткам уровень мочевины составил 7,9 мг/мл после введения МСК и 7,6 мг/мл после введения МВ, что на 21% ниже, чем в глицерол-контроле. Показано, МВ, продуцируемые МСК, дозозависимо стимулируют пролиферацию как спленоцитов, так и клеток почечной ткани. Для исследования устойчивости к апоптозу, использовали спленоциты как от интактных мышей, так и от мышей с глицерол-индуцированной ОПН. Добавление МВ вызывает снижение уровня апоптоза как у интактных мышей (21,73%) так и мышей с ОПН (13,28%). Соответственно, обратно-пропорционально, увеличивался процент клеток, находящихся в S/M фазе клеточного цикла.

Ключевые слова: мезенхимальные стволовые клетки (МСК), микровезикулы (МВ), острая почечная недостаточность (ОПН)

DOI: 10.31857/S102872210006505-0

Адрес: 630099 Новосибирск, ул. Ядринцевская, д. 14, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», лаборатория клеточных биотехнологий, Селедцова Галина Викторовна.

Тел.: (383) 222 26 74, факс: (383) 222 70 28

E-mail: niiki01@online.nsk.su

Авторы:

Хабалова Т. С., аспирант, лаборант-исследователь лаборатории клеточных биотехнологий, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», Новосибирск, Россия;

Кашенко Э. А., к. м. н., научный сотрудник лаборатории клеточных биотехнологий, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», Новосибирск, Россия;

Селедцова Г. В., д. м. н., заведующая лабораторией клеточных биотехнологий, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», Новосибирск, Россия.

АКТУАЛЬНОСТЬ

За последние несколько лет было показано, что мезенхимальные стволовые клетки (МСК) осуществляют цитопротективное действие стимуляцией эндогенной регенерацией резидентных клеток, а не процессами хоминга и дифференцировки [1]. Одним из механизмов подобного действия могут быть внеклеточные везикулы (эк-

зосомы и микровезикулы), которые сохраняют свойства клеток, из которых были получены [2]. Кроме того, МСК обладают иммунорегуляторными свойствами [3], которыми могут обладать и продуцируемые МСК МВ, но данный вопрос остается неизученным.

Целью работы было исследование иммунорегуляторных свойств МВ, продуцируемых МСК и их вклад в прорегенераторное действие МВ на почечную ткань.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперимент проведен на линейных мышах линии С57В16 возрастом 3–4 месяца. Острую почечную недостаточность индуцировали однократным внутримышечным введением 50% глицерола в дозе 8.6 мг/кг.

Мезенхимальные стволовые клетки были получены из костного мозга сингенных мышей С57В16 методом адгезии к культуральному пластику. Клетки культивировали в стандартных условиях.

После достижения монослоя, часть МСК подвергали апоптозу путем культивирования в условиях депривации кислорода и в бессывороточной среде в течение 1 суток. Через 24 часа супернатант центрифугировали при 2000 g в течение 15 минут для удаления клеточного дробиса. Надосадок дополнительно центрифугировали при 10000 g в течение 60 минут при 4 °С. Полученный в итоге осадок ресуспендировали в 100 мкл физиологического раствора. Для стандартизации суспензии МВ, определяли содержание белка по методу Брэдфорда.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Использование МСК и МВ приводило практически к одинаковому результату: на 4-е сутки уровень мочевины составил 9,3 мкг/мл и 9,37 мкг/мл соответственно, что на 25% ниже, чем в глицерол-контроле 12,43 мкг/мл (у интактных мышей – 6,59 мкг/мл). К 8-м суткам уровень мочевины составил 7,9 мкг/мл после введения МСК и 7,6 мкг/мл после введения МВ, что на 21% ниже, чем в глицерол-контроле 9,64 мкг/мл. Уровень пролиферации спленоцитов в тесте с ³Н-тимидином составил 118 имп/мин, КонА-стимулированная пролиферация составила 1208 имп/мин. В присутствии МВ в дозе 10 мкг/мл пролиферативная способность спленоцитов увеличилась почти в 3 раза (342 имп/мин – спонтанная, 3889 имп/мин – КонА-стимулированная). МВ в дозе 30 мкг/мл: 475 имп/мин – спонтан-

ная и 4667 имп/мин – КонА-стимулированная; 492 имп/мин – спонтанная и 5012 имп/мин – КонА-стимулированная при добавлении МВ в дозе 90 мкг/мл. Добавление МВ в культуральную среду на 3 суток в дозе 10 мкг/мл повышало пролиферацию почечных эпителиоцитов (ПЭ) в 4 раза (254 имп/мин против 65 имп/мин в контроле). Увеличение дозы МВ также повышало пролиферацию ПЭ: 337 имп/мин при дозе МВ 30 мкг/мл и 392 имп/мин при дозе МВ 90 мкг/мл. Влияние МВ на апоптогенное действие доксорубина на спленоциты определяли в тесте с окраской пропидиум иодидом. Интересно, что сама по себе индукция ОПН вызывает уменьшение апоптозных спленоцитов почти в 2 раза (16,3% против 29,17% у интактных мышей). Добавление МВ вызывает снижение уровня апоптоза как у интактных мышей (21,73%) так и мышей с ОПН (13,28%).

ОБСУЖДЕНИЕ

Таким образом, полученные в результате эксперимента *in vivo* результаты показали, что внутривенное введение как МСК, так и МВ, продуцируемых МСК, в одинаковой степени приводит к более раннему восстановлению выделительной функции почек после глицерол-индуцированной ОПН. Это говорит о том, что про-регенераторное действие МСК в значительной степени, если не полностью, обусловлено продуцируемыми ими микровезикулярными частицами. Указанное действие МВ подтверждается результатами *in vitro* – продуцируемые МСК микровезикулярные частицы усиливали пролиферацию ПЭ, причем при увеличении дозы МВ это влияние усиливалось. Аналогичное действие МВ оказывают на клетки иммунной системы: *in vitro* отмечается дозозависимое усиление пролиферации спленоцитов и увеличение их устойчивости к влиянию апоптогенных факторов. То есть продуцируемые МСК микровезикулярные частицы оказывают иммуностимулирующее действие. Этот результат противоречит литературным данным, что при ОПН, независимо от генеза, наблюдается активация иммунной системы, приводящая к усилению повреждения и про-регенераторное действие МСК обусловлено их иммуносупрессорным действием.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Morigi M., Rota C., Remuzzi G. Mesenchymal stem cells in kidney repair. *Methods Mol Biol.* 2016, 1416, 89–107.

2. Gatti S., Bruno S., Deregibus M. C., Sordi A., Cantaluppi V., Tetta C., Camussi G. Microvesicles derived from human adult mesenchymal stem cells protect against ischaemia–reperfusion-induced acute and chronic kidney injury. *Nephrol Dial Transplant* 2011, 26, 1474–1483.
3. Castro-Manreza M. E., Montesinos J. J. Immunoregulation by Mesenchymal Stem Cells: biological aspects and clinical applications. *J. Immunol Res.* 2015, 2015, 394917.

EFFECT OF TRANSPLANTATION OF MESENCHYMAL STEM CELLS (MSC) AND PRODUCED MICROVESICLES (MV) ON THE MAINTENANCE OF MEMORY T-CELLS AND T-REGULATORY CELLS IN THE MODEL ACUTE RENAL FAILURE IN MICE

© 2019 T. S. Khabalova*, E. A. Kaschenko, G. V. Seledtsova

*E-mail: khabalovat@gmail.com

Federal State Budget Scientific Institution “Scientific Research Institute of fundamental and clinical immunology” (SRIFCI). Novosibirsk, Russia

Received: 14.03.2019. **Accepted:** 29.03.2019

MV has been shown to have a positive effect on the restoration of renal excretory function at a level comparable to the effect of MSCs. The use of MSC and MB in the treatment of acute renal failure resulted in almost the same result: on the 4th day the level of urea was 9.3 µg/ml and 9.37 µg/ml, respectively, which is 25% lower than in the glycerol control. By the 8th day, the level of urea was 7.9 µg/ml after the introduction of MSC and 7.6 µg/ml after the introduction of MB, which is 21% lower than in the glycerol control. It has been shown that the MW produced by MSCs stimulate the proliferation of both splenocytes and cells of the kidney tissue in a dose-dependent manner. To study the resistance to apoptosis, splenocytes were used both from intact mice and from glycerol-induced ARF. The addition of MB causes a decrease in the level of apoptosis in both intact mice (21.73%) and mice with ARF (13.28%). Accordingly, inversely, the percentage of cells in the S / M phase of the cell cycle increased.

Key words: mesenchymal stem cells (MSC), microvesicles (MV), acute renal failure (ARF)

Authors:

Khabalova T. S., Junior Researcher, Laboratory of Molecular Mechanisms Head of the Laboratory of Cell Biotechnology, Federal State Budget Scientific Institution “Scientific Research Institute of fundamental and clinical immunology” (SRIFCI). Novosibirsk, Russia;

Kaschenko E. A., Researcher, Laboratory of Molecular Mechanisms Head of the Laboratory of Cell Biotechnology, Federal State Budget Scientific Institution “Scientific Research Institute of fundamental and clinical immunology” (SRIFCI). Novosibirsk, Russia;

Seledtsova G. V., ☒ PhD, Head, Leading Reseacher of Cell Biotechnology Laboratory, Federal State Budget Scientific Institution “Scientific Research Institute of fundamental and clinical immunology” (SRIFCI). Novosibirsk, Russia. **E-mail:** niiki01@online.nsk.su

ВЛИЯНИЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК (МСК) И ИМИ ПРОДУЦИРУЕМЫХ МИКРОВЕЗИКУЛ (МВ) НА СОДЕРЖАНИЕ Т-КЛЕТОК ПАМЯТИ И Т-РЕГУЛЯТОРНЫХ КЛЕТОК В МОДЕЛИ ОСТРОЙ ПОЧЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ (ОПН) МЫШЕЙ

© 2019 г. Т. С. Хабалова*, Э. А. Кащенко, Г. В. Селедцова

*E-mail: khabalovat@gmail.com

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», Новосибирск, Россия;

Поступила: 14.03.2019. Принята: 26.03.2019

Целью работы стало исследование воздействия мезенхимальных стволовых клеток (МСК) и продуцируемыми ими микровезикулами (МВ) на параметры клеточного иммунитета у мышей с индуцированной ОПН. Эксперименты проведены на линейных мышах C57BL/6 возрастом 3–4 месяца. Острую почечную недостаточность (ОПН) индуцировали однократным введением 50% глицерола. Мезенхимальные стволовые клетки получали из костного мозга здоровых животных, культивировали в стандартных условиях. В исследование вошли такие параметры клеточного иммунитета, как Т-клетки памяти и Т-регуляторные клетки. В качестве контроля были использованы клетки линии L929 и полученные из них микровезикулы (L929-MV). Зарегистрирована тенденция к спонтанному снижению содержания CD4⁺CD44⁺CD62L⁺, CD8⁺CD44⁺CD62L⁺- Т-клеток памяти и регуляторных CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ клеток к 11 суткам постановки эксперимента. Эффекты применения клеток и микровезикул из них отличались по степени выраженности воздействия на клетки иммунной системы. Более выраженным действием обладали L929-MV на 11 сутки эксперимента. В процессе постановки эксперимента обнаружена тенденция прироста регуляторных CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Т-клеток при использовании как МСК и L929, так и полученных из них микровезикул. Природа используемых клеток и полученных из них микровезикул не оказывала существенного значения на конечный результат экспериментов.

Ключевые слова: мезенхимальные стволовые клетки (МСК), микровезикулы (МВ), острая почечная недостаточность (ОПН)

DOI: 10.31857/S102872210006504-9

Адрес: 630099 Новосибирск, ул. Ядринцевская, д. 14, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», лаборатория клеточных биотехнологий, Селедцова Галина Викторовна.

Тел.: (383) 222 26 74, факс: (383) 222 70 28

E-mail: niiki01@online.nsk.su

Авторы:

Хабалова Т. С., аспирант, лаборант-исследователь лаборатории клеточных биотехнологий, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», Новосибирск, Россия;

Кащенко Э. А., к. м. н., научный сотрудник лаборатории клеточных биотехнологий, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», Новосибирск, Россия;

Селедцова Г. В., д. м. н., заведующая лабораторией клеточных биотехнологий, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», Новосибирск, Россия.

АКТУАЛЬНОСТЬ

Микровезикулы представляют собой новую перспективу для бесклеточной терапии острой почечной недостаточности. В ряде экспериментальных исследований было показано, что МВ сохраняют характеристики клеток, из которых были получены. Так, например, микровезикулы, полученные из стволовых клеток, могут оказывать регенеративное действие, в том числе при остром повреждении тубулярного эпителия почечных канальцев индуцированном внутримышечным введением глицерола [1]. При остром повреждении почки, независимо от генеза, наблюдается локальная повышенная активность многих компонентов иммунной системы [2].

Эксперименты с адаптивным переносом активированных макрофагов, Т и В-лимфоцитов [3] показали их отрицательную роль в патогенезе ОПН. В то же время, МСК обладают иммунорегуляторными свойствами [4], которыми могут обладать и МВ, полученные из МСК, но данный вопрос остается неизученным.

Таким образом, целью нашей работы было исследование воздействия МСК и МВ, ими продуцируемыми на параметры клеточного иммунитета у мышей с индуцированной ОПН.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Модель острой почечной недостаточности. Эксперимент проведен на линейных мышах линии C57BL6 возрастом 3–4 месяца. Острую почечную недостаточность индуцировали однократным внутримышечным введением 50% глицерола в дозе 8.6 мг/кг.

Получение мезенхимальных стволовых клеток костного мозга. Мезенхимальные стволовые клетки были получены из костного мозга сингенных мышей C57BL6 методом адгезии к культуральному пластику. Клетки культивировали в стандартных условиях, в исследовании использовался 2 пассаж.

Получение микровезикулярных частиц. После достижения монослоя, часть МСК подвергали апоптозу путем культивирования в условиях депривации кислорода и в бессывороточной среде в течение 1 суток. Через 24 часа супернатант центрифугировали при 2000 g в течение 15 минут для удаления клеточного дебриса. Надосадок дополнительно центрифугировали при 10000 g в течение 60 минут при 4 °С. Полученный в итоге осадок ресуспендировали в 100 мкл физиологического раствора.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Было проведено исследование содержания Т-клеток памяти, регуляторных клеток в плазме крови мышей с ОПН на 4 и 11 сутки эксперимента, после трансплантации МСК и ими продуцируемыми МВ. В качестве контроля были использованы клетки фибробластной линии L929 и полученные из них микровезикулы (L929-MV). Клеток линии L929 являются фибробластоподобной прилипающей к пластику культурой, а также имеют тот же генотип, что и МСК, полученные от мышей C57BL6 (H-2b). Зарегистрирована тенденция к спонтанному снижению содержания $CD4^+CD44^+CD62L^+$,

$CD8^+CD44^+CD62L^+$ Т-клеток памяти и регуляторных $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ клеток. Эффекты применения клеток и микровезикул не существенно отличались по воздействию на клетки иммунной системы. Более выраженным действием обладали микровезикулы, причем МВ из L929 снижали содержание клеток памяти более выражено на 11 сутки эксперимента.

В процессе постановки эксперимента обнаружена тенденция прироста регуляторных $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ Т-клеток как при использовании МСК и L929, так и полученных из них микровезикул. Природа используемых клеток и полученных из них микровезикул не оказывала существенного значения на конечный результат экспериментов.

ОБСУЖДЕНИЕ

Про-регенераторное действие МСК в значительной степени, если не полностью, обусловлено продуцируемыми ими микровезикулярными частицами. Указанное действие клеток и продуцируемых ими МВ не является специфичным. Клетки фибробластной линии L929 и продуцируемые ими МВ обладали такими же воздействиями, как и МСК. МВ из L929 были также более активны в рамках воздействия на Т-клетки памяти и регуляторные клетки. Показана тенденция прироста Т-рег клеток к 11 суткам эксперимента. Таким образом, в процесс уменьшения воспаления после развития ОПН активно вовлечены регуляторные клетки. Эффекты применения мезенхимальных стволовых клеток и микровезикул не существенно отличались по воздействию на клетки иммунной системы. Более выраженным действием обладали микровезикулы, причем МВ из L929 снижали содержание клеток памяти более выражено на 11 сутки эксперимента.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Grange C., Iampietro C., Bussolati B. Stem cell extracellular vesicles and kidney injury. *Stem Cell Investig.* 2017, 4, 90.
2. Lee S.A., Noel S., Sadasivam M., Hamad A.R.A., Rabb H. Role of immune cells in acute kidney injury and repair. *Nefron* 2017, 137, 282–286.
3. Friedewald J.J., Rabb H. Inflammatory cells in ischemic acute renal failure. *Kidney int.* 2004, 66, 2486–491.
4. Castro-Manreza M.E., Montesinos J.J. Immunoregulation by Mesenchymal Stem Cells: biological aspects and clinical applications. *J. Immunol Res.* 2015, 2015, 394917.

**EFFECT OF TRANSPLANTATION OF MESENCHYMAL STEM CELLS (MSC)
AND PRODUCED MICROVESICLES (MV) ON THE MAINTENANCE
OF MEMORY T-CELLS AND T-REGULATORY CELLS IN THE MODEL
ACUTE RENAL FAILURE IN MICE**

© 2019 T. S. Khabalova*, E. A. Kaschenko, G. V. Seledtsova

*E-mail: khabalovat@gmail.com

Federal State Budget Scientific Institution "Scientific Research Institute of fundamental and clinical immunology" (SRIFCI). Novosibirsk, Russia

Received: 14.03.2019. Accepted: 26.03.2019

The aim of the work was to study the effect of mesenchymal stem cells (MSCs) and microvesicles (MV) produced by them on the parameters of cellular immunity in mice with induced ARF. The experiments were carried out on C57Bl6 linear mice aged 3–4 months. Acute renal failure (ARF) was induced by a single injection of 50% glycerol. Mesenchymal stem cells were obtained from the bone marrow of healthy animals, cultured under standard conditions. The study included such parameters of cellular immunity as memory T-cells and T-regulatory cells. L929 cells and microvesicles derived from them (L929-MV) were used as controls. A tendency towards a spontaneous decrease in the content of CD4⁺CD44⁺CD62L⁺, CD8⁺CD44⁺CD62L⁺ T-cells of memory and regulatory CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ cells was recorded. 11 days of the experiment. The effects of the application of cells and microvesicles of them differed in the severity of the impact on the cells of the immune system. L929-MV had a more pronounced effect on the 11th day of the experiment. In the course of the experiment, a tendency was observed for the growth of regulatory CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T cells using both MSC and L929, and microvesicles derived from them. The nature of the cells used and the microvesicles obtained from them did not have a significant effect on the final result of the experiments.

Key words: mesenchymal stem cells (MSC), microvesicles (MV), chronic renal failure (CRF)

Authors:

Khabalova T. S., Junior Researcher, Laboratory of Molecular Mechanisms Head of the Laboratory of Cell Biotechnology, Federal State Budget Scientific Institution "Scientific Research Institute of fundamental and clinical immunology" (SRIFCI). Novosibirsk, Russia;

Kaschenko E. A., Researcher, Laboratory of Molecular Mechanisms Head of the Laboratory of Cell Biotechnology, Federal State Budget Scientific Institution "Scientific Research Institute of fundamental and clinical immunology" (SRIFCI). Novosibirsk, Russia;

Seledtsova G. V., ☒ PhD, Head, Leading Researcher of Cell Biotechnology Laboratory, Federal State Budget Scientific Institution "Scientific Research Institute of fundamental and clinical immunology" (SRIFCI). Novosibirsk, Russia. **E-mail:** niiki01@online.nsk.su

ЦИТОКИНОВЫЙ ПРОФИЛЬ СЫВОРОТКИ КРОВИ И МИНДАЛИН У ДЕТЕЙ С ХРОНИЧЕСКИМ ТОНЗИЛЛИТОМ НА ФОНЕ ГЕРПЕСВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ

© 2019 г. З. Ф. Хараева^{1*}, Э. К. Азаматова², Ж. Т. Балаева¹,
М. Т. Тлакадугова¹, З. А. Шомахова¹

*E-mail: irafe@yandex.ru

¹Кабардино-Балкарский государственный университет им. Х. М. Бербекова, Нальчик, Россия;

²ГБУЗ Детская поликлиника № 2, Нальчик, Россия

Поступила: 15.03.2019. Принята: 02.04.2019

Обследованы дети с хроническим тонзиллитом на фоне цитомегаловирусной или вирус Эпштейна-Барр инфекции. В качестве лабораторных показателей локального и общего цитокинового статуса исследовали ИЛ-1 β , ИЛ-6, ФНО α , ИЛ-10 в сыворотке крови и смывах с миндалин. Выявлено нарушение равновесия провоспалительных и противовоспалительных цитокинов в группе пациентов с хроническим тонзиллитом. Сопутствующая герпесвирусная инфекция усугубляет выявленные тенденции, приводя к более значимому локальному нарушению антимикробной защиты.

Ключевые слова: иммуноцитокينات, хронический тонзиллит, цитомегаловирусная инфекция, ВЭБ-инфекция

DOI: 10.31857/S102872210006503-8

Адрес: 360000, Нальчик, ул. И. Арманд, д. 1, ФГБОУ ВО «Кабардино-Балкарский государственный университет им. Х.М.Бербекова», кафедра микробиологии, вирусологии и иммунологии, Хараева Заира Феликсовна.

Тел./факс: +7(88662) 77 53 67, 8928 708 91 66 (моб.).

E-mail: irafe@yandex.ru

Авторы:

Хараева З. Ф., д.м.н, профессор, заведующая кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии медицинского факультета КБГУ им. Х. М. Бербекова, Нальчик, Россия;

Азаматова Э. К., к.м.н., врач-оториноларинголог ГБУЗ Детская поликлиника № 2 г. Нальчика, Россия;

Балаева Ж. Т., аспирант Кабардино-Балкарского государственного университета им. Х. М. Бербекова, Нальчик, Россия;

Тлакадугова М. Х., к.м.н., доцент кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии медицинского факультета КБГУ им. Х. М. Бербекова, Нальчик, Россия;

Шомахова З. А., аспирант Кабардино-Балкарского государственного университета им. Х.М.Бербекова, Нальчик, Россия.

Последнее время отмечается рост заболеваемости хроническим тонзиллитом (ХТ) на фоне герпесвирусных инфекций [1]. Известно, что вирусные белки непосредственно оказывают иммунодепрессивное действие на организм, кроме

того герпес вирусы 4 и 5 типов (вирус Эпштейна-Барр, цитомегаловирус) изменяют реактивность организма, в том числе подавляя противомикробный иммунитет [2, 3]. Баланс цитокинов провоспалительной и противовоспалительной групп является основой для адекватного иммунного ответа на микробный антиген.

Цель исследования: оценка провоспалительных иммуноцитокينات – интерлейкина-1 β (ИЛ-1 β), интерлейкина-6 (ИЛ-6), фактора некроза опухоли α (ФНО α), противовоспалительного иммуноцитокина интерлейкина-10 (ИЛ-10) в сыворотке крови детей с хроническим тонзиллитом на фоне цитомегаловирусной инфекции (ЦМВИ) или на фоне инфекции, вызванной вирусом Эпштейна-Барр (ВЭБ).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В момент рецидива ХТ обследовано 104 ребенка в возрасте 8–12 лет, среди них 50 девочек и 64 мальчика. Критериями включения в группу исследования являлось наличие ХТ декомпенсированной формы (по классификации

И. Б. Солдатова), декомпенсация проявлялась частыми рецидивами ангина (3–5 рецидивов в год). В исследование были включены дети с приобретенной латентной формой после перенесенной острой ЦМВИ или ВЭБ инфекции (по классификации А. П. Казанцева и Н. И. Поповой). ЦМВИ и ВЭБ инфекция подтверждались данными ПЦР или ИФА (ЦМВИ – 65 детей: 30 девочек, 35 мальчиков; ВЭБ инфекция у 39 детей: 21 девочка, 18 мальчиков). Группой сравнения служили дети с ХТ без сопутствующей вирусной инфекции (отсутствие АТ к ЦМВ и ВЭБ) 32 человека, а также дети с первичным тонзиллитом в период обострения (29 человек) и здоровые дети (20 человек) в возрасте от 9 до 11 лет. В качестве лабораторных показателей локального и общего цитокинового статуса исследовали содержание группы провоспалительных иммуноцитоклинов – ИЛ-1 β , ИЛ-6, ФНО α , ИЛ-10 в сыворотке крови и смывах с миндалин. Все показатели изучались с помощью иммуноферментного метода с применением тест-систем «Протеиновый контур» (СПб, Россия). Полученные результаты обрабатывали с использованием общепринятых статистических методов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для выяснения доли ХТ в структуре всей ЛОР-патологии были проанализированы отчетные данные двух детских поликлиник г. Нальчика. Оказалось, что количество пациентов, состоящих на диспансерном учете с диагнозом ХТ, составило в период с 2010 по 2018 гг. в среднем 49,3% (45,2–55,5%) от общей заболеваемости ЛОР органов. То есть ХТ превалирует среди остальной патологии ЛОР-органов. ЦМВИ была выявлена у 34% больных детей с ХТ (по данным ПЦР и ИФА), ВЭБ инфекция у 16% детей с ХТ. В ответ на микробную агрессию в момент рецидива или в период первичного тонзиллита у детей с хроническими и острыми тонзиллитами уровень провоспалительных цитокинов в крови повышался ($p < 0,01$). Однако, уровень каждого из исследуемых цитокинов (ИЛ-1 β , ИЛ-6) у детей с хроническим тонзиллитом ниже соответствующей концентрации в крови детей с острыми тонзиллитами ($p < 0,01$). В то же время концентрации ИЛ-1 β и ИЛ-6 в сыворотке крови детей с ХТ на фоне герпесвирусных инфекций были достоверно ниже уровня у группы с ХТ без ЦМВИ и ВЭБ ($p < 0,01$). Похожая закономерность уровня ИЛ-1 β и Ил-6 была вы-

явлена и в смывах с миндалин, что подтверждает системный характер изменений. ФНО α в группах пациентов с хроническим тонзиллитом (на фоне ЦМВ и ВЭБ) и у здоровых детей не определялся, в то время как у детей с первичным тонзиллитом и ХТ без сопутствующей вирусной инфекции был повышен. Отсутствие определяемых концентраций ФНО α на фоне достоверно сниженных показателей интерлейкинов приводят к заключению о существовании декомпенсации местного иммунитета, своеобразному локальному иммунодефициту, приводящему к функциональной недостаточности гуморального и клеточного иммунитета. ИЛ-10 в группе детей с хроническим тонзиллитом без сопутствующей вирусной инфекции и на фоне ЦМВ и ВЭБ не отличался от здоровых доноров. У детей с первично возникшим острым тонзиллитом концентрация ИЛ-10 была достоверно ниже нормальных значений ($< 0,01$). Сопутствующая герпесвирусная инфекция усугубляет выявленные тенденции, приводя к более значимому локальному нарушению антимикробной защиты. Подобное соотношение медиаторов, регулирующих активность воспалительной реакции, создает предпосылки, как к хронизации гнойного процесса, так и к нарушению репарации ткани миндалин.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Любошенко Т. М. Клинико-иммунологическая характеристика больных с цитомегаловирусной инфекцией. Омский научный вестник. 2014, 2(134), 129–132. [Luboshenko M. Clinical and immunological characteristics of patients with cytomegalovirus infection. Omsk scientific Bulletin. 2014.2 (134), 129–132].
2. Разгуляева А. В., Уханова О. П., Безроднова С. М. Современные представления об этиологии, патогенезе, клинике и лечении инфекционного мононуклеоза у детей. // Наука. Инновации. Технологии. 2012, 78, № 1, 222–227. [Razgulyaeva, A. V., Ukhanova O. P., Bezrodnova S. M. Modern ideas about the etiology, pathogenesis, clinic and treatment of infectious mononucleosis in children. Science. Innovations. Technologies. 2012.78, № 1, 222–227].
3. Тюркина С. И., Минасян В. С., Савенкова М. С., Буллих А. В. Структура инфицирования и влияние герпес-вирусов и атипичных патогенов на течение хронического аденоидита в группе часто болеющих детей. Российская оториноларингология. 2015, № 5, 69–76. [Tyurkina S. I., Minasyan V. S., Savenkova M. S., Bullich A. V. Structure of infection and the impact of the herpes viruses and atypical pathogens on the course of chronic adenoiditis in the group of frequently ill children. Russian otorhinolaryngology. 2015, № 5, 69–76].

**CYTOKINE PROFILE OF SERUM AND TONSILS IN CHILDREN
WITH CHRONIC TONSILLITIS IN THE BACKGROUND
OF HERPESVIRUS INFECTIONS**

© 2019 **Z. F. Kharaeva^{1*}, E. K. Azamatova², J. T. Balaeva¹,
M. T. Tlakadugova¹, Z. A. Shomakhova¹**

**E-mail: irafe@yandex.ru*

¹*Kabardino-Balkarian State University Berbekov's named, Nalchik, Russia;*

²*GBUZ Children's polyclinic № 2, Nalchik, Russia*

Received: 15.03.2019. **Accepted:** 02.04.2019

The study included children with chronic tonsillitis in the background cytomegalovirus or virus Epshtein-Barr infection. IL-1 β , IL-6, TNF, IL-10 in blood serum and washes from tonsils were studied as laboratory parameters of local and general cytokine status. Imbalance of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the group of patients with chronic tonsillitis was revealed. Concomitant herpes virus infection exacerbates tendencies, leading to more meaningful local violation of the anti-microbial protection.

Key words: immunocytokines, chronic tonsillitis, cytomegalovirus infection, EBV infection

Authors:

Kharaeva Z. F., ✉ PhD, Professor, head of the Department of Microbiology, Virology and Immunology of the medical faculty of KBSU, Nalchik, Russia. **E-mail:** irafe@yandex.ru;

Azamatova E. K., PhD, otolaryngologist, MBUZ Detskaya poliklinika № 2 in Nalchik, Russia;

Balaeva Zh. T., post-graduate student of KBSU, Nalchik, Russia;

Tlakadugova M. H., MD, PhD, associate Professor in the Department of Microbiology, Virology and immunology of the medical faculty of KBSU, Nalchik, Russia;

Shomakhova Z. A., post-graduate student of KBSU, Nalchik, Russia.

СОДЕРЖАНИЕ ГАЛЕКТИНОВ-2, -9 И СУБПОПУЛЯЦИЙ МОНОЦИТОВ КРОВИ ПРИ ПАТОЛОГИИ ЛЕГКИХ ИНФЕКЦИОННОГО И НЕИНФЕКЦИОННОГО ГЕНЕЗА

© 2019 г. С. П. Чумакова, М. В. Винс*, О. И. Уразова, Е. Б. Букреева, А. А. Буланова, Е. Г. Чурина, А. В. Ситникова, В. В. Новицкий

*E-mail: wmw_1991@mail.ru

ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет»
Минздрава РФ, Томск, Россия

Поступила: 27.02.2019. Принята: 12.03.2019

Обследовано 15 больных инфильтративным туберкулезом легких (ТЛ), 16 больных хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ) и 12 здоровых доноров, в крови которых оценивали относительное количество CD14^{hi}CD16⁻, CD14^{hi}CD16^{lo}, CD14^{lo}CD16^{lo} и CD14^{lo}CD16⁻ моноцитов методом проточной цитофлуориметрии и концентрацию галектинов-2 и -9 методом иммуноферментного анализа. Показано, что для ТЛ характерно увеличение числа CD14^{hi}CD16^{lo} моноцитов, дифференцирующихся из CD14^{hi}CD16⁻ клеток, при снижении концентрации галектина-2 и количества CD14^{lo}CD16⁻ моноцитов в крови. При ХОБЛ отмечается увеличение концентрации галектина-9 и доли CD14^{hi}CD16⁻ моноцитов на фоне дефицита остальных субпопуляций этих клеток в крови.

Ключевые слова: галектины, субпопуляции моноцитов, хроническая обструктивная болезнь легких, туберкулез

DOI: 10.31857/S102872210006502-7

Адрес: 634050 Томск, Московский тр., 2, ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, кафедра патофизиологии, Винс Мария Васильевна. Тел.: +7(3822) 901101, доб.1742, 89138472993 (моб.).

E-mail: wmw_1991@mail.ru

Авторы:

Чумакова С. П., д.м.н., профессор кафедры патофизиологии ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России, Томск, Россия;

Винс М. В., ассистент кафедры патофизиологии ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России, Томск, Россия;

Уразова О. И., д.м.н., профессор, член-корр. РАН, заведующий кафедрой патофизиологии ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России, Томск, Россия;

Букреева Е. Б., д.м.н., профессор кафедры пропедевтики внутренних болезней с курсом терапии педиатрического факультета ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России, Томск, Россия;

Буланова А. А., к.м.н., ассистент кафедры пропедевтики внутренних болезней с курсом терапии педиатрического факультета ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России, Томск, Россия;

Чурина Е. Г., д.м.н., профессор кафедры патофизиологии ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России, Томск, Россия.

Ситникова А. В., аспирант кафедры патофизиологии ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России, Томск, Россия;

Новицкий В. В., д.м.н., профессор, академик РАН, заслуженный деятель науки РФ, профессор кафедры патофизиологии ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России, Томск, Россия.

зиологии ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России, Томск, Россия.

АКТУАЛЬНОСТЬ

Известно, что галектины влияют на созревание иммунокомпетентных клеток. Так, галектин-2 способствует генерации M1-макрофагов, угнетает M2-клетки и модулирует ангиогенез [1], а галектин-9 индуцирует образование M2-макрофагов и Th2-лимфоцитов [2]. Возможно, дифференцировка моноцитов крови на субтипы то же подвержена регуляции галектинами [3]. Поскольку эти клетки принимают активное участие в защите организма от инфекционных (например, при туберкулезе легких, ТЛ) и неинфекционных агентов (например, при хронической обструктивной болезни легких, ХОБЛ), то галектины могут определять характер их реагирования при действии стимулов различной природы.

Цель работы – провести комплексную оценку изменений содержания галектинов-2 и -9 и отдельных субпопуляций моноцитов в крови

при заболеваниях легких инфекционного и неинфекционного генеза, ассоциированных с дыхательной гипоксией.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.

Обследовано 15 больных (11 мужчин и 4 женщины) в возрасте $47,81 \pm 3,12$ лет с инфильтративным ТЛ до проведения противотуберкулезной терапии, 16 больных (10 мужчин и 6 женщин) в возрасте $52,16 \pm 4,37$ лет с эмфизематозной формой ХОБЛ и 12 здоровых доноров, сопоставимых по полу и возрасту. Венозную кровь в объеме 5 мл забирали утром натощак и стабилизировали гепарином (25 МЕ/мл). В крови определяли относительное количество классических ($CD14^{hi}CD16^{-}$), промежуточных ($CD14^{hi}CD16^{lo}$), неклассических ($CD14^{lo}CD16^{lo}$) и переходных ($CD14^{lo}CD16^{-}$) моноцитов методом проточной цитометрии (цитофлуориметр «Accuri C6» «BD Biosciens», США), принимая за 100% все клетки, положительные по CD14. Использовали моноклональные антитела CD14-FITC и CD16-PE («BD Biosciens», США) и лизирующий раствор («BD Biosciens», США), согласно инструкциям производителя. Содержание галектинов-2 и -9 в плазме крови определяли методом иммуноферментного анализа с помощью наборов «Human Galectin-2 ELISAKit» и «Human Galectin-9 ELISAKit» («Clou-Clone-Corp», США). Статистический анализ проводили с помощью критерия Манна-Уитни и коэффициента корреляции Спирмена. Результаты считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Показано, что у больных ХОБЛ определяется увеличение численности классических (до $80,56 (77,60; 83,55)\%$, $p < 0,05$) и дефицит промежуточных ($10,38 (9,36; 11,26)\%$, $p < 0,05$), неклассических ($6,03 (5,24; 6,77)\%$, $p < 0,05$) и переходных ($2,14 (1,41; 3,92)\%$, $p < 0,05$) моноцитов в крови по сравнению с нормой (соответственно $67,75 (64,34; 70,65)$, $14,36 (12,06; 14,98)$, $10,07 (9,34; 13,84)$ и $6,80 (5,03; 6,87)\%$). У больных ТЛ обнаруживалось повышение числа промежуточных моноцитов (до $26,24 (22,38; 42,88)\%$, $p < 0,01$) при недостаточности количества переходных клеток ($1,77 (1,36; 3,74)\%$, $p < 0,01$) и нормальном содержании классических и неклассических моноцитов. Взаимосвязь между численностью классических и промежуточных моноцитов у больных ХОБЛ ($r = -0,63$; $p < 0,05$) и ТЛ ($r = -0,72$; $p < 0,01$) отражает способность классических моноцитов

к ускоренному созреванию в промежуточные клетки при патологии (у здоровых доноров подобная связь отсутствовала). Вероятно, антигенная стимуляция моноцитарно-макрофагальной системы (при ТЛ) вызывает ускоренную дифференцировку классических моноцитов в промежуточные клетки, способные к презентации антигена [4], а действие факторов неантигенной природы (при ХОБЛ) блокирует этот процесс, опосредуя накопление активно фагоцитирующих моноцитов [4]. В крови больных ТЛ отмечался дефицит галектина-2 ($3,85 (1,55; 10,88)$ пг/мл, $p < 0,05$ против $13,50 (11,50; 17,00)$ пг/мл в контроле) и соответствующий норме ($0,16 (0,00; 1,50)$ пг/мл) уровень галектина-9. У больных ХОБЛ, напротив, отмечался избыток галектина-9 ($8,50 (3,96; 15,00)$ пг/мл, $p < 0,001$ по сравнению с контролем) в сочетании с нормальной концентрацией галектина-2 в крови. Увеличение содержания галектина-9 в крови при ХОБЛ может быть обусловлено фиброзом в легких, поскольку данная молекула синтезируется фибробластами [5]. Следовательно, профицит галектина-9 ассоциирован с активацией созревания классических моноцитов, а недостаточность галектина-2 — со стимуляцией дифференцировки промежуточных моноцитов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Субпопуляционный состав моноцитов крови при ТЛ характеризуется увеличением числа промежуточных моноцитов, дифференцирующихся из классических клеток, при снижении концентрации галектина-2 и количества переходных моноцитов в крови. При неинфекционной патологии легких (ХОБЛ), отмечается увеличение концентрации галектина-9 и численности классических моноцитов на фоне дефицита остальных субпопуляций этих клеток в крови.

Исследование поддержано грантами РФФИ (договор № 18-015-00160/18) и Совета по грантам Президента РФ (НШ-2690.2018.7 и МД-2788.2019.7).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Yildirim C., Vogel D. Y., Hollander M. R., Baggen J. M., Fontijn R. D., Nieuwenhuis S., Haverkamp A., de Vries M. R., Quax P. H., Garcia-Vallejo J. J., van der Laan A. M., Dijkstra C. D., van der PouwKraan T. C., van Royen N., Horrevoets A. J. Galectin-2 induces a proinflammatory, anti-arteriogenic phenotype in monocytes and macrophages. *PLoS One*, 2015, 10, 4, e0124347.
2. Enninga E. A., Nevala W. K., Holtan S. G., Leontovich A. A., Markovic S. N. Galectin-9 modulates im-

- munity by promoting Th2/M2 differentiation and impacts survival in patients with metastatic melanoma. *Melanoma Res.*, 2016, 26, 5, 429–441.
3. *Barisionea C., Garibaldia S., Ghigliottia G., Fabbia P., Altieria P., Casalea M., Spallarossaa P., Berteroa G., Balbia M., Corsigliab L., Brunellia C.* CD14CD16 monocyte subset levels in heart failure patients. *Dis. Markers*, 2010, 115–124.
 4. *Ханин А.Л., Кравец С.Л.* Хроническая обструктивная болезнь легких и туберкулез: актуальная проблема в реальной практике (обзор литературы). *Вестник современной клинической медицины*, 2017, 6, 60–70. [*Khanin A. L., Kravets S. L.* Chronic obstructive pulmonary disease and tuberculosis: an actual problem in real practice (literature review). *Herald of modern clinical medicine*, 2017, 6, 60–70.]
 5. *Chihara M., Kurita M., Yoshihara Y., Asahina A., and Yanaba K.* Clinical Significance of Serum Galectin-9 and Soluble CD155 Levels in Patients with Systemic Sclerosis. *J Immunol Res.* 2018, 9473243.

CONTENT OF GALECTINS-2, -9 AND SUBPOPULATIONS OF BLOOD MONOCYTES IN PATHOLOGY OF LUNG INFECTIOUS AND NON-INFECTIOUS GENESIS

© 2019 S. P. Chumakova, M. V. Vins*, O. I. Urazova, E. B. Bukreeva, A. A. Bulanova, E. G. Churina, A. V. Sitnikova, V. V. Novitsky

*E-mail: wmw_1991@mail.ru

Siberian State Medical University, Tomsk, Russia

Received: 27.02.2019. **Accepted:** 12.03.2019

15 patients with infiltrative pulmonary tuberculosis (TB), 16 patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and 12 healthy donors were examined. Amount of CD14^{hi}CD16⁻, CD14^{hi}CD16^{lo}, CD14^{lo}CD16^{lo} and CD14^{lo}CD16⁻ monocytes in the blood was evaluated by flow-cytometry, and galectin-2 and -9 concentration was measured by ELISA. Increase in the number of CD14^{hi}CD16^{lo} monocytes, differentiated from the CD14^{hi}CD16⁻ cells, and decrease in the content of galectin-2 and CD14^{lo}CD16⁻ monocytes in the blood were characteristic of TB. In COPD, an increase in the concentration of galectin-9 and the proportion of CD14^{hi}CD16⁻ monocytes against the background of deficiency of other their subpopulations in the blood was noted.

Key words: galectins, monocytes subpopulations, chronic obstructive pulmonary disease, tuberculosis

Authors:

Chumakova S. P., Doctor of Medical Sciences, Professor at the Department of Pathophysiology, SSMU, Tomsk, Russia;

Vins M. V., ☒ Assistant at the Department of Pathophysiology, SSMU, Tomsk, Russia. **E-mail:** wmw_1991@mail.ru;

Urazova O. I., Doctor of Medical Sciences, Professor, Corresponding Member of the RAS, Head of the Department of Pathophysiology, SSMU, Tomsk, Russia;

Bukreeva E. B., Doctor of Medical Sciences, Professor of the Department of Internal Medicine Propaedeutics with the course of therapy of the Pediatric faculty, SSMU, Tomsk, Russia;

Bulanova A. A., PhD of Medical Sciences, Assistant of the Department of Internal Medicine Propaedeutics with the course of therapy of the Pediatric Faculty, SSMU, Tomsk, Russia;

Churina E. G., Doctor of Medical Sciences, Professor at the Department of Pathophysiology, SSMU, Tomsk, Russia;

Sitnikova A. V., Postgraduate at the Department of Pathophysiology, SSMU, Tomsk, Russia;

Novitsky V. V., Doctor of Medical Sciences, Professor, Academician of the RAS, Honored Scientist of the Russian Federation, Professor of the Department of Pathophysiology, SSMU, Tomsk, Russia.

РОЛЬ ЭНДОГЕННОЙ ОПИОИДНОЙ СИСТЕМЫ В РЕГУЛЯЦИИ АНТИТЕЛОГЕНЕЗА ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ХОЛОДОВОМ СТРЕССЕ

© 2019 г. И. Л. Шаравьева^{1*}, С. В. Гейн^{1,2}

*E-mail: irin.sh@gmail.com

¹ФГБУН «Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН», Пермь, Россия;

²ФГБОУВО «Пермский государственный национальный
исследовательский университет», Пермь, Россия

Поступила: 01.03.2019. Принята: 13.03.2019

Установлено, что в условиях хронического холодового стресса у мышей снижалось абсолютное и относительное количество антителообразующих клеток в селезенке. Блокада опиатных рецепторов приводила к отмене угнетающего влияния стресса на антителогенез.

Ключевые слова: антителообразующие клетки, хронический холодовой стресс, опиоидные пептиды

DOI: 10.31857/S102872210006501-6

Адрес: 614081 Пермь, «Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» – филиал ФГБУН Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук (ПФИЦ УрО РАН), Шаравьева Ирина Леонидовна.

Тел./факс: (8342) 2108759 (сл.), 8 912 781-81-25 (моб.).

E-mail: irin.sh@gmail.com

Авторы:

Шаравьева И. Л., к.б.н., научный сотрудник ФГБУ «Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН», Пермь, Россия;

Гейн С. В., д.м.н., заместитель директора по научной работе «Института экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук» – филиала ПФИЦ УрО РАН, Пермь, Россия; профессор кафедры микробиологии и иммунологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Пермский государственный национальный исследовательский университет», Пермь, Россия;

Эндогенная опиоидная система считается важнейшей стресс-лимитирующей системой и активируется в процессе развития стресса [1]. Опиоидные пептиды присутствуют в различных органах и тканях организма: центральной и периферической нервной системе, желудочно-кишечном тракте и иммунной системе. Они принимают участие в регуляции ряда физиологических функций: анальгезия, эмоциональное состояние, иммунорегуляция [2]. Помимо этого, клетки иммунной системы в определенных

условиях, например в процессе развития воспалительной реакции, способны секретировать опиоидные пептиды [3]. Влияние стресса на иммунную систему носит разнонаправленный характер и зависит от различных причин: природа стрессорного агента, длительности воздействия, состояние организма в целом. Ранее нами было показано, что эндогенная опиоидная система принимает участие в регуляции функций иммунной системы при ротационном и иммобилизационном стрессах [4].

Цель работы – оценить влияние хронического холодового стресса на антителогенез в селезенке и регионарном лимфатическом узле в условиях блокады опиатных рецепторов.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Эксперимент выполнен на белых мышам-самцах массой тела 20–22 г. Животных содержали в условиях лабораторного вивария, при естественном освещении, неограниченном доступе к воде и кормам. Выведение из эксперимента мышей проводили путем декапитации под эфирным наркозом. Хронический холодовой стресс индуцировали охлаждением мышей при 4 °С в течение 4 часов на протяжении 7 суток. Антагонист опиатных рецепторов налоксона

гидрохлорид в дозе 0,2 мг/кг («Narcan», США) вводили подкожно за 20 мин до стресса, а также повторно через 3 ч после начала стресса. Все животные были разбиты на следующие группы: 1-я – контрольная, 2-я – стресс (хронический ходовой), 3-я – стресс на фоне налоксона, 4-я – двукратное введение налоксона. Одну половину животных после окончания стрессорного воздействия (на 7 сутки эксперимента) одномоментно иммунизировали эритроцитами барана внутрибрюшинно однократно (10^8 клеток в 0,2 мл 0,9% NaCl). Другую половину животных сразу после окончания стресса (на 7 сутки) иммунизировали эритроцитами барана в правую лапу однократно (10^8 клеток в 0,02 мл 0,9% NaCl). На 5-е сутки после иммунизации оценивали клеточность и количество антителообразующих клеток в селезенке (АОК) или регионарном лимфатическом узле. Количество АОК оценивали методом локального гемолиза в геле агарозы [5]. Статистический анализ результатов проводили с использованием непарного t-критерия Стьюдента для межгруппового сравнения.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Установлено, что в условиях системной иммунизации у мышей, подвергнутых хроническому холодовому стрессу в период индукции иммунного ответа, наблюдалось значительное снижение интенсивности образования АОК в селезенке по абсолютным и относительным показателям. На фоне налоксона угнетающее действие стресса на абсолютное и относительное количество АОК отменялось. В условиях локальной иммунизации под действием хронического холодового стресса отмечалось достоверное снижение относительного, но не абсолютного количества АОК регионарного лимфатического узла, число АОК в третьей группе не отличалось от контрольных значений. При изолированном

введении блокаторов опиатных рецепторов количество АОК не отличалось от показателей контрольной группы, как при системной, так и при локальной иммунизации. На клеточность селезенки и регионарных лимфоузлов мышей хронический холодовой стресс и антагонист опиатных рецепторов статистически значимого влияния не оказывали.

Таким образом, хронический холодовой стресс приводит к угнетению продукции АОК в селезенке, которое нивелируется блокадой опиатных рецепторов, что в свою очередь свидетельствует о том, что эндогенная опиоидная система играет важную роль в регуляции иммунного ответа при хроническом холодовом стрессе.

Работа выполнена в рамках проекта № госрегистрации темы: АААА-А18-118030790046-9, поддержанного Комплексной программой Уральского отделения Российской академии наук.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. *Vuong C., Van Uum S. H., O'Dell L. E., Lutfy K., Friedman T. C.* The effects of opioids and opioid analogs on animal and human endocrine systems. *Endocr Rev.*, 2010, 31(1), 98–132.
2. *Toubia T., Khalife T.* The Endogenous opioid system: role and dysfunction caused by opioid therapy. *Clin Obstet Gynecol.*, 2019, 62, 3–10.
3. *Kido K., Shindo Y., Toda S., Masaki E.* Expression of β -endorphin in peripheral tissues after systemic administration of lipopolysaccharide as a model of endotoxic shock in mice. *Ann Endocrinol*, 2018, 18, 30095–7.
4. *Гейн С. В., Шаравьева И. Л.* Влияние блокады опиатных рецепторов на антителогенез и пролиферативный ответ спленоцитов при стрессе. *Экспериментальная и клиническая фармакология*, 2013, 1, 30–34. [*Gein S. V., Sharav'eva I. L.* The effect of opiate receptor blockade on antithogenesis and proliferative response of splenocytes during stress. *Experimental and Clinical Pharmacology*, 2013, 1, 30–34].
5. *Jerne N. K., Nordin A. A.* Plaque formation in agar by single antibody-producing cells. *Science*, 1963, 140, 405.

THE ROLE OF THE ENDOGENOUS OPIOID SYSTEM IN THE REGULATION OF ANTIBODY GENESIS DURING CHRONIC COLD STRESS

© 2019 I. L. Sharav'eva^{1*}, S. V. Gein^{1,2}

*E-mail: irin.sh@gmail.com

¹Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, UB RAS, Perm, Russia;

²Perm State University, Perm, Russia

Received: 01.03.2019. **Accepted:** 13.03.2019

It was established that under conditions of chronic cold stress in mice, a decrease in the absolute and relative amount of antibody-forming cells in the spleen was observed. The blockade of opiate receptors led to the abolition of oppression.

Key words: antibody-forming cells, chronic cold stress, opioid peptides

Authors:

Sharav'eva I. L., ✉ PhD, researcher of the laboratory of biochemistry of development of microorganisms Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, UB RAS, Perm, Russia. **E-mail:** irin.sh@gmail.com;

Gein S. V., doctor of medicine deputy director for research Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Perm, Russia; professor Department of microbiology and immunology Perm State Research University, Perm, Russia.

ЭФФЕКТЫ ОСТРОГО ХОЛОДОВОГО СТРЕССА НА ПРОДУКЦИЮ IFN γ И IL-12 СПЛЕНОЦИТАМИ МЫШИ

© 2019 г. И.Л. Шаравьева^{1*}, С.П. Тендрякова^{1,2}

*E-mail: irin.sh@gmail.com

¹ФГБУН «Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН», Пермь, Россия;

²ФГБОУВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет», Пермь, Россия

Поступила: 28.02.2019. Принята: 11.03.2019

Исследовано влияние холодого стресса на продукцию активных форм кислорода (АФК) и IFN γ и IL-12 спустя 6 часов после окончания стресса. Установлено, что острый холодого стресс (-20°C в течение 60 мин) приводил к усилению спонтанной и зимозан-стимулированной продукции АФК клетками перитонеальной полости мыши через 6 часов после окончания стрессорного воздействия. В аналогичных экспериментальных условиях уровни IFN γ в спонтанных культурах спленоцитов мышей возрастали, тогда как в стимулированных снижались.

Ключевые слова: хемилюминесценция, цитокины, холодого стресс, макрофаги, спленоциты

DOI: 10.31857/S102872210006500-5

Адрес: 614081 Пермь, «Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» – филиал ФГБУН Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук (ПФИЦ УрО РАН), Шаравьева Ирина Леонидовна.

Тел./факс: (8342) 2108759 (сл.), 8 912 781-81-25 (моб.).

E-mail: irin.sh@gmail.com

Авторы:

Шаравьева И.Л., к.б.н., научный сотрудник ФГБУ «Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН», Пермь, Россия

Тендрякова С.П., к.х.н., старший научный сотрудник ФГБУ «Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН», Пермь, Россия; доцент кафедры микробиологии и иммунологии ФГБОУВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет», Пермь, Россия.

Острый холодого стресс является одним из мощнейших факторов, влияющих на организм человека и животных. Он развивается в результате действия низких температур и модулирует работу различных органов и систем – нейрогуморальной, сердечно-сосудистой, иммунной [1]. В результате действия острого холодого стресса может происходить как усиление, так и ослабление отдельных иммунных функций и показателей, а также состояния иммунного ответа в целом. Может изменяться интенсивность таких процессов, как фагоцитоз, пролиферация, продукция Th1/Th2 (IL-2, IL-4, IFN γ), про- и противовоспалительных цитокинов (IL-1 β ,

TNF α , IL-6, IL-10) [2, 3]. Изменения, происходящие при стрессе в иммунной системе, сохраняются определенное время после окончания стрессорного воздействия. Ранее нами было показано, что острое переохлаждение (-20°C в течение 60 мин) приводит к усилению реакции ЛЗХЛ и продукции цитокинов клетками перитонеальной полости мышей [4].

Цель работы – оценить влияние острого холодого стресса на продукцию активных форм кислорода, IFN γ и IL-12 перитонеальными клетками мыши через 6 ч после окончания стрессорного воздействия *in vivo*.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Эксперимент выполнен на белых мышках самцах массой тела 20–22 г. Животных содержали в условиях лабораторного вивария, при естественном освещении, неограниченном доступе к воде и кормам. В работе использовали модель холодого стресса. Мышей охлаждали при -20°C в течение 10 или 60 мин однократно. Все животные были разбиты на следующие группы: 1-я – контрольная, 2-я – охлаждение при -20°C в течение 10 мин, 3-я – охлаждение при -20°C в течение 60 мин. Мышей выводили из эксперимента методом декапитации под эфирным наркозом спустя 6 ч после окончания переохлаждения.

дения. Перитонеальные лейкоциты выделяли по стандартной методике, селезенку выделяли и гомогенизировали для получения спленоцитов. Оценку продукции АФК перитонеальными клетками осуществляли с использованием реакции люминол-зависимой хемилюминесценции (ЛЗХЛ). Для определения продукции цитокинов спленоциты культивировали в среде RPMI 1640 с добавлением 10 mM HEPES («Sigma»), 2 mM L-глутамин («Sigma»), 100 мкг/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 10% ЭТС («Биолот», г. Санкт-Петербург) в 24-луночных планшетах содержащих $2,5 \times 10^6$ клеток на лунку. Через 12 ч (для детекции IL-12) и 24 ч (для детекции IFN γ) супернатанты собирали в пробирки «Эппендорфф», замораживали и хранили при -20°C . Определение концентрации цитокинов в супернатантах клеточных культур проводили с использованием иммуноферментных тест-систем «R&D» в соответствии с инструкцией производителя (США). Статистическая обработка результатов проведена с использованием непарного t-критерия Стьюдента для межгруппового сравнения.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Установлено, что в спонтанных культурах клеток перитонеальной полости с 25 мин по 55 мин наблюдения отмечалось увеличение продукции АФК при проведении реакции ЛЗХЛ через 6 ч после окончания 60-минутного охлаждения. Под влиянием 10 мин охлаждения не отмечалось изменения продукции АФК клетками перитонеальной полости в аналогичные сроки (в аналогичных условиях) исследования. В стимулированных зимозаном культурах клеток перитонеальной полости спустя 6 ч после исследования отмечалось значительное увеличение продукции АФК на фоне 60-минутного охлаждения. Тогда как на фоне 10 мин охлаждения не было зафиксировано изменения продукции АФК. При анализе продукции цитокинов были получены следующие результаты. Под действием острого 60-минутного переохлаждения через шесть часов после окончания холодного воздействия отмечается значимое увеличение продукции INF γ в спонтанных культурах спленоцитов мышей, 10-минутное переохлаждение же не приводило к изменениям концентраций данного цитокина в спонтанных культурах. В стимулированных культурах угнетение продукции INF γ наблюдалось после воздействия охлажде-

ния 60 мин, но не после 10-минутного варианта переохлаждения. На продукцию IL-12 значимого влияния данные экспериментальные модели не оказывали.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, кратковременное 10-минутное охлаждение не изменяло функциональную активность клеток перитонеальной полости и спленоцитов спустя 6 ч после окончания стрессового воздействия, тогда как более продолжительное 60-минутное переохлаждение приводило к изменениям функциональной активности перитонеальных лейкоцитов и спленоцитов. Ранее нами было показано, что у животных, выведенных из эксперимента сразу после окончания стрессорного воздействия, увеличивалась продукция АФК при 60-минутном стрессе, и снижалась при 10-минутном стрессе [4]. Можно сделать вывод, что постстрессорные изменения фагоцитарной активности перитонеальных лимфоцитов и спленоцитов мыши сохраняются определенное время после исключения действия низкотемпературного стресса и зависят от его длительности.

Работа выполнена в рамках проекта № госрегистрации темы: АААА-А18-118030790046-9, поддержанного Комплексной программой Уральского отделения Российской академии наук.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. *DhaBhar F. S.* The short-term stress response – Mother nature’s mechanism for enhancing protection and performance under conditions of threat, challenge, and opportunity. *Frontiers in Neuroendocrinology*. 2018, 49, 175–192.
2. *Sesti-Costa R., Ignacchiti M. D., Chedraoui-Silva S. Marchi L. F., Mantovani B.* Chronic cold stress in mice induces a regulatory phenotype in macrophages: correlation with increased 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase expression. *Brain Behav Immun*. 2012, 26, 50–60.
3. *Zhu G. F., Chancellor-Freeland C., Berman A. S., Lee-man S. E., Beller D. I., Black P. H.* Endogenous substance P mediates cold water stress-induced increase in interleukin-6 secretion from peritoneal macrophages. 1996, *J. Neurosci.*, 16, 3745–3752.
4. *Гейн С. В., Шаравьева И. Л.* Влияние холодного стресса на функциональную активность перитонеальных макрофагов мыши в условиях блокады опиатных рецепторов. 2016, *Российский физиологический журнал им. И. М. Сеченова*, 2, 188–194. [*Gein S. V., Sharav'eva I. L.* Influence of cold stress on functional activity of mouse peritoneal macrophages under opiate receptors blockade. 2016, *Russian Journal of Physiology*, 2, 188–194].

EFFECTS OF ACUTE COLD STRESS ON IFN γ AND IL-12 PRODUCTION BY MICE SPLENOCYTES

© 2019 I. L. Sharav'eva^{1*}, S. P. Tendryakova^{1,2}

*E-mail: irin.sh@gmail.com

¹Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, UB RAS, Perm, Russia;

²Perm State University, Perm, Russia

Received: 28.02.2019. Accepted: 11.03.2019

The effect of cold stress on the production of reactive oxygen species (ROS) and IFN- γ and IL-12 was studied 6 hours after the end of stress. It was established that acute cold stress (-20°C for 60 min) led to increased spontaneous and zymosan-stimulated production of ROS by mouse peritoneal cavity cells 6 hours after the end of stress exposure. In similar experimental conditions, the levels of interferon- γ in spontaneous splenocytes mice increased, while in stimulated mice decreased.

Key words: chemiluminescence, cytokines, cold stress, macrophages, splenocytes

Authors:

Sharav'eva I. L., ✉ PhD, researcher of the laboratory of biochemistry of development of microorganisms Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, UB RAS, Perm, Russia. **E-mail:** irin.sh@gmail.com;

Tendryakova S. P., PhD, senior researcher of the laboratory of ecological immunology Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, UB RAS, Perm, Russia; docent Department of microbiology and immunology Perm State University, Perm, Russia.

ИММУННЫЙ СТАТУС ПРИ ОСТРОМ ОБСТРУКТИВНОМ И НЕОБСТРУКТИВНОМ ПИЕЛОНЕФРИТЕ

© 2019 г. М. Н. Шатохин^{1,2*}, М. Ю. Маврин², В. А. Рагулина³,
К. В. Хорляков³

*E-mail: sh.77@mail.ru

¹ГБОУ ДПО «Российская медицинская академия последипломного образования»
Минздрава РФ, Москва, Россия;

²Урологический центр НУЗ «Научный клинический центр ОАО
«Российские железные дороги», Москва, Россия;

³ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» Минздрава РФ,
Курск, Россия

Поступила: 24.02.2019. Принята: 07.03.2019

Под наблюдением находились пациенты с диагнозом острый необструктивный (ОНП) и обструктивный пиелонефрит (ООП) (соответственно 31 и 30 пациентов), проходившие стационарное лечение в урологическом центре НУЗ Научный клинический центр ОАО «РЖД». Определяли уровень цитокинов, компонентов комплемента и их ингибиторов в плазме крови и первой порции утренней мочи, фагоцитарную и кислородзависимую активность нейтрофилов циркулирующей крови. На системном уровне у больных ОНП, в большей степени при ООП, до начала лечения установлено повышение концентрации провоспалительных цитокинов (TNF α , IL-6, IL-8 и IFN γ), IFN α , IL-4 и IL-10, компонентов комплемента C₃ и C_{5a}, снижение уровня IL-1RA и регулятора системы комплемента фактора H, снижение активности и интенсивности фагоцитоза нейтрофилов периферической крови при повышении активности кислородзависимых систем. До лечения на местном уровне (в моче) у больных с ОНП установлено повышение концентрации всех изученных цитокинов, кроме IL-4, компонентов C₃ и C₅ и снижение IL-1RA. При ООП изменения были более выраженными, за исключением сниженного уровня фактора H и sIgA.

Ключевые слова: острый необструктивный и обструктивный пиелонефрит, иммунный статус

DOI: 10.31857/S102872210006499-3

Адрес: 125993, Москва, Волоколамское шоссе, 84, ГБОУ ДПО «Российская медицинская академия последипломного образования» Минздрава России, Шатохин Максим Николаевич. Тел.: 8 916 962-79-19. **E-mail:** sh.77@mail.ru

Авторы:

Шатохин М. Н., д.м.н., доцент, профессор кафедры эндоскопической урологии ГБОУ ДПО «Российская медицинская академия последипломного образования» Минздрава России, Москва, Россия;

Маврин М. Ю., к.м.н., врач-уролог урологического центра НУЗ «Научный клинический центр ОАО «РЖД», Москва, Россия;

Рагулина В. А., к.б.н., доцент кафедры биохимии ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» Минздрава России, Курск, Россия;

Хорляков К. В., аспирант кафедры управления и экономики фармации ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» Минздрава России, Курск, Россия.

При многих видах урологической патологии по мере прогрессирования бактериально-воспалительного процесса развивается и усугубляется иммунологическая недостаточность, обусловленная, с одной стороны, с реинфицированием очага, с другой стороны, истощением резервов иммунной системы и негативными эффектами на иммунитет антибиотикотерапии [1–3]. В то же время большинство исследований, посвященных изучению иммунных и оксидантных нарушений, развитию дисфункции эндотелия, проведены на пациентах с острой формой или при обострении урологического заболевания, в том числе и хронического пиелонефрита, без учета первично или вторично возникшего заболевания, сопутствующей соматической патологии, локализации процесса, стадий и форм заболевания [3, 4].

В связи с этим, целью исследования стало установление характера и направленности иммунных изменений у больных острым обструктивным и необструктивным пиелонефритом.

ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ МЕТОДЫ

Под наблюдением находились пациенты с диагнозом острый необструктивный и обструктивный пиелонефрит (ОНП, ООП), проходившие стационарное лечение в урологическом центре НУЗ Научный клинический центр ОАО «РЖД». 61 пациент (38 женщин и 23 мужчины) в возрасте $41,5 \pm 3,9$ лет, в том числе 31 больной ОНП (1-я группа) и 30 человек с ООП (2-я группа), рандомизированных по полу, возрасту, минимальным сопутствующим заболеваниям в стадии ремиссии. Забор крови и мочи, к которой добавляли консервант «Proclin 300», производили до начала комплексного лечения. Кроме того, изучены иммунологические показатели в образцах крови и мочи 20 здоровых доноров, сформировавших контрольную группу. Уровень цитокинов, компонентов комплемента и их ингибиторов определяли в плазме крови и первой порции утренней мочи. Цитокины и sIgA выявляли методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием коммерческих наборов ЗАО «Вектор-Бест». Компоненты системы комплемента и фактор Н определяли с помощью диагностических наборов ООО «Цитокин». Активность C_1 -ингибитора определяли хромогенным методом по способности ингибировать C_1 -эстеразу. Фагоцитарную активность полиморфно-ядерных лейкоцитов крови оценивали, определяя фагоцитарный индекс, фагоцитарное число и индекс активности фагоцитоза. Активность кислородзависимых систем нейтрофилов оценивали спектрофотометрически по реакции восстановления нитросинего тетразолия, спонтанного и стимулированного зимозаном, индексу стимуляции и функциональному резерву нейтрофилов. Статистическую обработку результатов исследования проводили с вычислением средних величин и ошибки средней арифметической. Существенность различий оценивали по U-критерию. Статистически значимыми считали различия с $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В плазме крови больных ОНП до начала лечения установлено повышение концентрации провоспалительных цитокинов (TNF α , IL-6, IL-8 и IFN γ), IFN α , IL-4 и IL-10, компонентов комплемента C_3 и C_{5a} , снижение уровня IL-1RA и регулятора системы комплемента фактора Н, снижение активности и интенсивности фагоцитоза нейтрофилов периферической крови при

повышении активности кислородзависимых систем. У пациентов с ООП выявлены в целом сходные по направленности, но значительно более выраженные изменения содержания цитокинов и компонентов комплемента в плазме крови. На местном уровне (в моче) у больных с ОНП установлено повышение концентрации всех изученных цитокинов, кроме IL-4, компонентов C_3 и C_5 и снижение IL-1RA. При ООП изменения были более выраженными, за исключением сниженного уровня фактора Н и sIgA. Выявленные общие и специфические изменения иммунологических показателей плазмы крови и мочи у больных ООП и ОНП не только дополняют текущие представления об иммунопатогенезе этих заболеваний, но и являются фундаментом для разработки методов ранней диагностики этих форм пиелонефрита. Кроме того, установленные дефекты фагоцитарной функции нейтрофилов в свете данных литературы о подавлении активности этих клеток возбудителями пиелонефрита создают задел для направленного поиска эффективных средств иммунокоррекции среди препаратов, воздействующих на фагоцитарное звено иммунитета, как важного компонента комплексного лечения и реабилитации больных ООП и ОНП. Кроме того, в качестве объектов выбора в этом плане внимания заслуживают средства, способные регулировать продукцию провоспалительных цитокинов и успешно применяемые при другой урологической патологии [4, 5].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Аполихин О. И., Сивков А. В., Бешлиев Д. А. Анализ уронефрологической заболеваемости в Российской Федерации по данным официальной статистики // Экспериментальная и клиническая урология. — 2010. — № 1. — С. 4–11. [Apolikhin O. I., Sivkov A. V., Beshliyev D. A. Analiz uronefrologicheskoy zabolovayemosti v Rossiyskoy Federatsii po dannym ofitsial'noy statistiki // Eksperimental'naya i klinicheskaya urologiya. — 2010. — № 1. — S. 4–11.]
2. Интегративная урология. Руководство для врачей / под ред. П. В. Глыбочко, Ю. Г. Аляева. — М.: «Медфорум», 2014. — 432 с. [Integrativnaya urologiya. Rukovodstvo dlya vrachey / pod red. P. V. Glybochko, Yu. G. Alyayeva. — M.: «Medforum», 2014. — 432 s.]
3. Конопля А. И., Теодорович О. В., Шатохин М. Н., Гаврилюк В. П., Краснов А. В. Хронический простатит, аденома предстательной железы и иммунитет. Урология. — 2013. — № 4. — С. 99–1034. [Konoplya A. I., Teodorovich O. V., Shatokhin M. N., Gavriilyuk V. P., Krasnov A. V. Khronicheskiy prostatit,

- adenoma predstatel'noy zhelezy i immunitet. Urologiya. — 2013. — № 4. — S. 99–1034.]
4. Шатохин М. Н., Теодорович О. В., Конопля А. И., Гаврилюк В. П., Маврин М. Ю., Краснов А. В. Иммунометаболические нарушения при хроническом бактериальном простатите и их коррекция // Урология. — 2011. — № 5. — С. 39–42. [Shatokhin M. N., Teodorovich O. V., Konoplya A. I., Gavriilyuk V. P., Mavrin M. Yu., Krasnov A. V. Immunometabolicheskiye narusheniya pri khronicheskom bakterial'nom prostatite i ikh korrektsiya // Urologiya. — 2011. — № 5. — S. 39–42.]
 5. Шатохин М. Н., Теодорович О. В., Конопля А. И., Мальцев В. Н., Локтионов А. Л., Краснов А. В. Коррекция местных иммунометаболических нарушений при аденоме предстательной железы в сочетании с хроническим простатитом // Урология. — 2010. — № 5. — С. 22–26. [Shatokhin M. N., Teodorovich O. V., Konoplya A. I., Mal'tsev V. N., Loktionov A. L., Krasnov A. V. Korrektsiya mestnykh immunometabolicheskikh narusheniy pri adenome predstatel'noy zhelezy v sochetanii s khronicheskim prostatitom // Urologiya. — 2010. — № 5. — S. 22–26.]

IMMUNE STATUS IN ACUTE OBSTRUCTIVE AND NONOBSTRUCTIVE PYELONEPHRITIS

© 2019 M. N. Shatokhin^{1,2*}, M. Yu. Mavrin², V. A. Ragulina³,
K. V. Khorlyakov³

*E-mail: sh.77@mail.ru

¹Russian Medical Academy of Postgraduate Education of Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia;

²Urological Center “Scientific Clinical Center OJSC Russian Railways”, Moscow, Russia;

³Kursk State Medical University, Kursk, Russia

Received: 24.02.2019. Accepted: 07.03.2019

The patients with a diagnosis of acute non-obstructive (ANOP) and obstructive pyelonephritis (AOP) (31 and 30 patients respectively) were under observation during treatment at the urological center of the National Healthcare Institution Scientific Clinical Center of Russian Railways. The levels of cytokines, complement components and their inhibitors in plasma and the first portion of morning urine, phagocytic and oxygen-dependent activity of circulating blood neutrophils were determined. At the systemic level, in patients with ANOP, to a greater extent in AOP, an increase in the concentration of pro-inflammatory cytokines (TNF α , IL-6, IL-8 and IFN γ), IFN α , IL-4 and IL-10, components of the C₃ and C_{5a} compliment was established, a decrease in the level of IL-1RA and a regulator of the complement factor H system, a decrease in the activity and intensity of phagocytosis of peripheral blood neutrophils with an increase in the activity of oxygen-dependent systems were also revealed. Before treatment at the local level (in the urine) in patients with ANOP, an increase in the concentration of all studied cytokines, except IL-4, components C₃ and C₅, and a decrease in IL-1RA was established. In AOP, changes were more pronounced, with the exception of a reduced level of factor H and sIgA.

Key words: acute non-obstructive and obstructive pyelonephritis, immune status

Authors:

Shatokhin M. N., ☒ Doctor of Medical Sciences, Associate Professor, Professor of the Department of Endoscopic Urology, Russian Medical Academy of Postgraduate Education, Ministry of Health of Russia, Moscow, Russia. **E-mail:** sh.77@mail.ru;

Mavrin M. Yu., Ph.D., urologist of the urological center of the National Research Medical University Scientific Clinical Center of JSC Russian Railways, Moscow, Russia;

Ragulina V. A., PdH, assistant of professor «Kursk State Medical University» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Kursk, Russia;

Khorlyakov K. V., Postgraduate Student, Department of Management and Economics of Pharmacy of Kursk State Medical University of the Ministry of Health of Russia, Kursk, Russia.

ФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ ИММУНОРЕАБИЛИТАЦИЯ У ПАЦИЕНТОВ С ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНЬЮ ЛЁГКИХ РЕГИОНА КУРСКОЙ МАГНИТНОЙ АНОМАЛИИ

© 2019 г. А. Н. Шелухина*, Е. Н. Конопля, Е. В. Гаврилюк,
В. П. Гаврилюк

*E-mail: sheluhina_angelika@mail.ru

ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет»
Минздрава РФ, Курск, Россия

Поступила: 28.02.2019. Принята: 12.03.2019

В исследование были включены 76 больных хронической обструктивной болезнью легких в возрасте от 35 до 50 лет (средний возраст – $42,5 \pm 2,7$ лет), из них – 38 больных постоянно проживали в г. Железногорск, а другие 38 пациентов в г. Курск. Использование ликопада у пациентов с хронической обструктивной болезнью лёгких г. Курска позволило скорректировать концентрацию ИЛ-10, ИНФ γ , тогда как у жителей г. Железногорска нормализует уровень IgM и корректирует концентрацию ФНО α , ИЛ-8, ИЛ-10, но не до уровня нормы.

Ключевые слова: хроническая обструктивная болезнь легких, цитокины, Курская магнитная аномалия

DOI: 10.31857/S102872210006499-3

Адрес: 305041, г. Курск, ул. К. Маркса, 3, ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» Минздрава России, кафедра внутренних болезней № 2, Шелухина Анжелика Николаевна. Тел.: 8 919 210-30-98 (моб.).

E-mail: sheluhina_angelika@mail.ru

Авторы:

Шелухина А. Н., ассистент кафедры пропедевтики внутренних болезней ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» Минздрава России, Курск, Россия;

Конопля Е. Н., д.м.н., профессор, заведующий кафедрой пропедевтики внутренних болезней ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» Минздрава России, Курск, Россия;

Гаврилюк Е. В., к.м.н., ассистент кафедры внутренних болезней № 2 ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» Минздрава России, Курск, Россия;

Гаврилюк В. П., д.м.н., заведующий кафедрой детской хирургии и педиатрии ФПО ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» Минздрава России, Курск, Россия.

В настоящее время неоспоримым является тот факт, что характер течения хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ) и степень выраженности иммунологических расстройств у жителей региона КМА может иметь отличия от других регионов [1–3].

В этой связи целью исследования стало оценить эффективность применения иммуномоду-

ляторов при лечении хронической обструктивной болезни легких у больных, проживающих в экологически неблагоприятном регионе Курской магнитной аномалии.

ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ МЕТОДЫ

Под наблюдением находились 76 больных ХОБЛ в возрасте от 35 до 50 лет (средний возраст – $42,5 \pm 2,7$ лет), из них – 38 больных постоянно проживали в г. Железногорск, а другие 38 пациентов в г. Курск. Клинический диагноз устанавливали на основании жалоб, анамнеза заболевания, данных объективного и лабораторно-инструментального исследований. Группа контроля состояла из 42 здоровых добровольцев – однократных доноров того же возраста, проживающих так же на территории г. Курска (21 человек) и г. Железногорска (21 человек). Все больные были разделены на 2 группы, в зависимости от проводимого лечения: первая опытная группа включала 38 пациентов с ХОБЛ (18 больных проживали в г. Курск, а 20 – в г. Железногорск), которым проводили стандартную консервативную терапию. Вторая группа включала 38 пациентов с ХОБЛ (20 боль-

ных в г. Курске и 18 в г. Железногорске), которым дополнительно назначался ликопид (1 мг 1 раз в сутки 14 дней). Уровень ФНО α , ИЛ-8, ИЛ-4, ИЛ-10, иммуноглобулинов классов М, G, А, интерферона-гамма выявляли методом ИФА с использованием наборов ЗАО «Вектор-Бест» (Россия).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Первоначально нами произведена была оценка уровня цитокинов в плазме крови у здоровых доноров в зависимости от уровня напряжённости геомагнитного поля региона проживания, при этом достоверных различий уровней цитокинов и иммуноглобулинов в плазме крови клинически здоровых людей, проживающих в регионах с фоновым (г. Курск) и повышенным (г. Железногорск) уровнями напряжённости геомагнитного поля выявлено не было. У больных ХОБЛ, проживающих в г. Курске, установлено увеличение содержания в плазме крови практически всех исследованных иммунологических показателей: ИЛ-4, ИЛ-10, ИНФ γ и ИЛ-8. У пациентов с ХОБЛ, проживающих на территории г. Железногорска, различия по сравнению с данными контроля установлены для тех же показателей, что и в группе курских больных. Однако степень их выраженности значительно различалась: уровень ИЛ-4 превышал значение здоровых лиц в 21 раз, ИНФ γ – в 8 раз, ИЛ-10 – в 7,8 раза, ФНО α – в 6,9 раза, ИЛ-8 – в 3 раза. У пациентов с ХОБЛ, проживающих на территории г. Курска, использование стандартной фармакотерапии позволило снизить, но не до уровня нормы, концентрацию в плазме крови ФНО α , ИЛ-4, ИНФ γ , IgM, не влияя на уровень остальных изучаемых показателей, а у пациентов с ХОБЛ, проживающих в г. Железногорске, также снижается концентрация ФНО α , ИЛ-4, ИНФ- γ , IgM, но не до уровня здоровых доноров. При использовании у пациентов с ХОБЛ – жителей г. Курска ликопида позволило дополнительно по сравнению со стандартной фармакотерапией нормализовать концентрацию IgG и уменьшить уровень в плазме крови ИЛ-10, ИНФ γ , но не до уровня нор-

мы. Назначение пациентам с ХОБЛ, постоянно проживающих на территории г. Железногорска, дополнительно к стандартной фармакотерапии ликопида позволило снизить по сравнению со стандартной терапией, но не до уровня нормы, концентрацию ФНО α , ИЛ-8, ИЛ-10 и ИНФ γ . Можно заключить, что использование ликопида у пациентов с хронической обструктивной болезнью лёгких г. Курска позволило корректировать концентрацию ИЛ-10, ИНФ γ , тогда как у жителей г. Железногорска нормализует уровень IgM и корректирует концентрацию ФНО α , ИЛ-8, ИЛ-10, но не до уровня нормы.

Таким образом, назначение дополнительно к стандартной фармакотерапии пациентам с ХОБЛ ликопида снижает количество иммунологических показателей, требующих дополнительной коррекции.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. *Бачинский О. Н., Бабкина В. И., Прибылов С. А., Иванов В. П., Трубникова Е. В., Полякова Н. В.* Системное воспаление при хронической обструктивной болезни легких профессиональной и непрофессиональной этиологии. Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье», 2011, 1, 26–30. [*Bachinsky O.N., Babkina V.I., Pribylov S.A., Ivanov V.P., Trubnikova E.V., Polyakova N.V.* Systemic inflammation in chronic obstructive pulmonary disease of occupational and non-professional etiology. Kursk scientific and practical bulletin «Man and his health», 2011, 1, 26–30].
2. *Шпагина Л. А., Котова О. С., Сараскина Л. Е., Ермакова М. А.* Особенности клеточно-молекулярных механизмов профессиональной хронической обструктивной болезни легких. Сибирское медицинское обозрение, 2018, 2(110), 37–45. [*Shpagina L. A., Kotova O.S., Saraskina L. E., Ermakova M. A.* Features of cellular and molecular mechanisms of occupational chronic obstructive pulmonary disease. Siberian Medical Review, 2018, 2 (110), 37–45].
3. *Гаврилюк Е. В., Конопля А. И., Караулов А. В.* Роль иммунных нарушений в патогенезе артериальной гипертензии. Иммунология, 2016, 37 (1), 29–34. [*Gavrilyuk E. V., Konoplya A. I., Karaulov A. V.* The role of immune disorders in the pathogenesis of arterial hypertension. Immunology, 2016, 37 (1), 29–34].

**PHARMACOLOGICAL IMMUNOREHABILITATION PATIENTS
WITH OBSTRUCTIVE LUNG DISEASE IN THE REGION
OF KURSK MAGNETIC ANOMALY**

© 2019 A. N. Shelukhina*, E. N. Konoplya, E. V. Gavrilyuk, V. P. Gavrilyuk

*E-mail: sheluhina_angelika@mail.ru
Kursk State Medical University, Kursk, Russia

Received: 28.02.2019. **Accepted:** 12.03.2019

The study included 76 patients with chronic obstructive pulmonary disease aged 35 to 50 years (mean age $42,5 \pm 2,7$ years), of which 38 patients resided permanently in Zheleznogorsk, and the other 38 patients in Kursk. The use of licopid in patients with chronic obstructive pulmonary disease in Kursk allowed to correct the concentration of IL-10, $INF\gamma$, whereas in residents of Zheleznogorsk it normalizes the IgM level and corrects the concentration of $TNF\alpha$, IL-8, IL-10, but not to the normal level.

Key words: chronic obstructive pulmonary disease, cytokines, Kursk Magnetic Anomaly

Authors:

Shelukhina A. N., ✉ Assistant of the Department of Internal Medicine Propaedeutic of Kursk State Medical University, Kursk, Russia. E-mail: sheluhina_angelika@mail.ru;

Konoplya A. I., MD, Professor, Head of the Department of Internal Medicine Propaedeutic of Kursk State Medical University, Kursk, Russia;

Gavrilyuk E. V., PhD, Assistant of the Department of Internal Diseases № 2 of Kursk State Medical University, Kursk, Russia;

Gavrilyuk V. P., MD, Head of the Department of Pediatric Surgery and Pediatrics of Kursk State Medical University, Kursk, Russia.

ВЛИЯНИЕ ОПСОНИНОВ СВЕЖЕЙ И ИНАКТИВИРОВАННОЙ ПРИ 56 °С СЫВОРОТКИ КРОВИ НА ЗИМОЗАН-ИНДУЦИРОВАННУЮ ПРОДУКЦИЮ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА ЛЕЙКОЦИТАМИ КРЫС

© 2019 г. Ю. И. Шилов^{1,2*}, А. П. Годовалов², Д. Ю. Шилов³,
С. Ю. Шилов^{1,2}, Daniel Eliáš⁴

*E-mail: jshilov@mail.ru

¹«Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук» – филиал ПФИЦ УрО РАН, Пермь, Россия;

²ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет им. акад. Е. А. Вагнера» Минздрава России, Пермь, Россия;

³ООО «МК «Семейный доктор», Москва, Россия;

⁴Charles University, Faculty of Medicine in Hradec Kralove, Hradec Kralove, Czech Republic

Поступила: 15.03.2019. Принята: 01.04.2019

Исследовали продукцию активных форм кислорода лейкоцитами крови и костного мозга в реакции люминолзависимой хемилюминесценции под действием неопсонизированного зимозана и зимозана, опсонизированного свежей или инактивированной при 56 °С аутологичной сывороткой. Установлено, что повышение показателей хемилюминесценции имеет место во всех трех вариантах активации фагоцитов, но в наибольшей степени оно выражено при использовании свежей сыворотки.

Ключевые слова: люминолзависимая хемилюминесценция, зимозан, опсонизация, лейкоциты крови, миелоциты, крысы

DOI: 10.31857/S102872210006498-2

Адрес: 614081, Пермский край, г. Пермь, ул. Голева, 13 «Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН», Шилов Юрий Иванович. Тел. +7(342) 2807442; факс (342) 2809211.

E-mail: jshilov@mail.ru

Авторы:

Шилов Ю. И., к.м.н., доцент, в.н.с., «Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук» – филиал ПФИЦ УрО РАН, Пермь, Россия;

Годовалов А. П., к.м.н., в.н.с. ЦНИЛ, доцент кафедры микробиологии и вирусологии ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет им. акад. Е. А. Вагнера» Минздрава России, Пермь, Россия;

Шилов Д. Ю., к.м.н., врач аллерголог-иммунолог, ведущий специалист ООО «МК «Семейный доктор», Москва, Россия;

Шилов С. Ю., к.м.н., м.н.с., «Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук» – филиал ПФИЦ УрО РАН, Пермь, Россия;

Daniel Eliáš, студент Charles University, Faculty of Medicine in Hradec Kralove, Hradec Kralove, Czech Republic.

Одним из наиболее широко используемых методов оценки продукции активных форм кислорода фагоцитами (АФК), связанной с ак-

тивацией НАДФН-оксидазы, является реакция люминолзависимой хемилюминесценции (ЛЗХЛ) [1]. В качестве стимулятора фагоцитирующих клеток наиболее часто используют опсонизированный зимозан [2]. С учетом возможности прямого активирующего действия неопсонизированного зимозана через TLR2/TLR6, бета-глюкановые рецепторы (в частности, дектин-1) на продукцию АФК [1], а также на фагоцитоз через рецепторы к Fc-фрагменту иммуноглобулинов и к другим опсонинам [2] представляется необходимым оценить их вклад в стимулированную реакцию ЛЗХЛ. Показано и дифференцированное влияние рецепторов к Fc-фрагменту IgG и к C3b-фрагменту комплемента на хемотаксис и поглотительную активность нейтрофилов при их активации зимозаном, опсонизированным свежей и прогретой при 56 °С сывороткой крови [3].

Цель работы – исследование влияния опсо-

в течение 30 мин сыворотки крови на зимозан-индуцированную продукцию АФК лейкоцитами крыс.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводили на интактных самцах нелинейных белых крыс в возрасте 4–6 месяцев. Лейкоциты крови выделяли методом седиментации с 0,1% метилцеллюлозой (Sigma-Aldrich, США), а клетки костного мозга – промыванием полости бедренной кости. При постановке реакции ЛЗХЛ в стимулированном варианте в лунках планшета (3915 Assay Plate 96 Well Flat bottom Black Polysterene, Corning Inc. Costar) смешивали 70 мкл раствора Хенкса без фенолового красного, 10 мкл натриевой соли люминола (Luminol sodium salt, Sigma, США) на растворе Хенкса (конечная концентрация 2×10^{-4} М), 10 мкл клеток (25×10^6 /мл) и 10 мкл неопсонизированного или опсонизированного аутологичной свежей или прогретой при 56 °С в течение 30 мин сывороткой крови зимозана (конечные концентрации 15, 150 и 1500 мкг/мл). Для опсонизации зимозана смесь равных объемов суспензии зимозана (в концентрации 15000 мкг/мл) и сыворотки инкубировали при 37 °С в течение 30 мин. После трехкратного отмывания центрифугированием с избытком изотонического раствора NaCl, концентрацию зимозана доводили до исходной. В спонтанном варианте реакции ЛЗХЛ смешивали те же компоненты, но вместо зимозана вносили 10 мкл раствора Хенкса. Измерение проводили на люминометре Luminoskan Ascent® Thermo Labsystems (тип измерения – kinetic, integration time – 1000 ms, интервал – 3 мин, meas. count – 60) в течение 180 мин. Для статистического анализа использовали интегральный показатель хемилюминесценции за весь период измерения (integral, RLU). Статистический анализ проводили с использованием методов описательной статистики и парного критерия Дункана.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Установлено, что внесение неопсонизированного зимозана приводит к статистически значимой и дозозависимой активации продукции АФК как лейкоцитами крови, так и клетками костного мозга в сравнении с показателями спонтанного варианта реакции ЛЗХЛ. Полученные данные подтверждают стимулирующее действие зимозана на продукцию АФК через паттернраспознающие рецепторы как классического PAMP, представляющего собой бе-

та-глюкан с бета-1-3-гликозидными связями. Установлено, что при внесении зимозана, опсонизированного прогретой при 56 °С в течение 30 мин сывороткой, продукция АФК клетками костного мозга дозозависимо повышается примерно в два раза в сравнении с неопсонизированным зимозаном в тех же концентрациях. Опсонизирующее действие прогретой сыворотки на продукцию АФК лейкоцитами крови выражено слабее и статистически значимо в сравнении с неопсонизированным зимозаном только при добавлении зимозана в самой высокой из исследованных концентраций (1500 мкг/мл). Ранее было показано, что прогревание сыворотки крови полностью отменяет ее способность стимулировать хемотаксис нейтрофилов, в то время как способность стимулировать адгезию и поглощение объектов фагоцитоза сохраняется [3]. В этой же работе методом проточной лазерной цитометрии доказано отсутствие на поверхности таких частиц зимозана С3b-компонента комплемента и наличие антител класса Ig G. Установлено, что самая высокая активация продукции АФК выявляется при добавлении к клеткам костного мозга зимозана, опсонизированного непрогретой сывороткой. Интегральные показатели хемилюминесценции примерно в 10–11 раз выше в сравнении с неопсонизированным зимозаном в тех же концентрациях ($p < 0,0001$), и в 3–6 раз выше в сравнении с теми же концентрациями зимозана, опсонизированного прогретой сывороткой ($p < 0,002$). Эта же закономерность выявляется и при исследовании продукции АФК лейкоцитами крови, но выраженность активации в сравнении с миелоцитами значительно ниже.

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ № 17-44-590995, № 17-44-590404 и Администрации Пермского края, а также в рамках государственного задания «ИЭГМ УрО РАН», номер государственной регистрации темы: 01201353248 и программы международных научных студенческих обменов International Federation of Medical Students' Associations (IFMSA) SCORE Research Exchange.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Makni-Maalej K., Chiandotto M., Hurtado-Nedelec M., Bedouhene S., Gougerot-Pocidallo M. A., Dang P. M., El-Benna J. Zymosan induces NADPH oxidase activation in human neutrophils by inducing the phosphorylation of p47phox and the activation of Rac2: involvement of protein tyrosine kinases, PI3Kinase, PKC, ERK1/2 and p38MAPkinase. *Biochem Pharmacol.* 2013, 85(1), 92–100.

2. Morris M. R., Dewitt S., Laffafian I., Hallett M. B. Phagocytosis by inflammatory phagocytes: experimental strategies for stimulation and quantification. *Methods Mol. Biol.* 2003, 225, 35–46.
3. Mankovich A. R., Lee C. Y., Heinrich V. Differential effects of serum heat treatment on chemotaxis and phagocytosis by human neutrophils. *PLoS One* 2013, 8(1), e54735. doi: 10.1371/journal.pone.0054735.

INFLUENCE OF OPSONINS OF FRESH AND INACTIVATED UNDER 56 °C BLOOD SERUM ON ZYMOSAN-INDUCED PRODUCTION OF REACTIVE OXYGEN SPECIES BY RAT LEUCOCYTES

© 2019 Ju. I. Shilov^{*1,2}, A. P. Godovalov², D. Ju. Shilov³, S. Ju. Shilov^{1,2}, Daniel Eliáš⁴

*E-mail: jshilov@mail.ru

¹*Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences* – a branch of the PFRC UB RAS, Perm, Russia;

²*Acad. E. A. Wagner Perm State Medical University, Perm, Russia;*

³*LLC MC “Family Doctor”, Moscow, Russia;*

⁴*Charles University, Faculty of Medicine in Hradec Kralove, Hradec Kralove, Czech Republic*

Received: 15.03.2019. Accepted: 01.04.2019

The production of reactive oxygen species by blood leukocytes and bone marrow cells in the reaction of luminol-dependent chemiluminescence under the action of non-opsonized zymosan and zymosan opsonized with fresh or inactivated autologous serum at 56 °C was investigated. It was established that an increase in the chemiluminescence levels takes place in all three variants of phagocyte activation, but it is most pronounced when using fresh serum.

Key words: luminol-dependent chemiluminescence, zymosan, opsonization, blood leukocytes, myelocytes, rats

Authors:

Shilov Ju. I., ☒ PhD, MD, Associate Professor, Leading Researcher, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms of the UB of the RAS, Perm, Russia. E-mail: jshilov@mail.ru;

Godovalov A. P., PhD, MD, Leading Researcher of Central Scientific Research Laboratory and Associate Professor of the Department of Microbiology and Virology, Acad. E. A. Wagner Perm State Medical University, Perm, Russia;

Shilov D. Ju., PhD, MD, Allergist-Immunologist, Leading Specialist, LLC MC “Family Doctor”, Moscow, Russia;

Shilov S. Ju., PhD, MD, Junior Researcher, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms of the UB of the RAS, Perm, Russia;

Daniel Eliáš, medical student, Charles University, Faculty of Medicine in Hradec Kralove, Hradec Kralove, Czech Republic.

ИЗМЕНЕНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ФАГОЦИТОЗА С МАРКЕРОМ АЦИДИФИКАЦИИ ФАГОСОМ pHrodo™ ПРИ ЗИМОЗАНОВОМ ПЕРИТОНИТЕ У КРЫС

© 2019 г. С. Ю. Шилов^{1,2*}, Ю. И. Шилов^{1,2}, Я. А. Туляев¹,
С. Ю. Барков²

*E-mail: stshilov@mail.ru

¹«Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук» – филиал ПФИЦ УрО РАН, Пермь, Россия;

²ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет им. акад. Е. А. Вагнера» Минздрава России, Пермь, Россия

Поступила: 15.03.2019. Принята: 28.03.2019

Исследовали изменение показателей фагоцитоза при 12-часовом зимозановом перитоните у крыс методом проточной лазерной цитометрии с использованием зимозана, меченого рН-сенситивным флуорохромом green pHrodo™ (Thermo Fisher Scientific). Выявлено увеличение абсолютных параметров фагоцитоза при исследовании клеток перитонеального экссудата, лейкоцитов крови и костного мозга у крыс с перитонитом в сравнении с интактными животными.

Ключевые слова: зимозановый перитонит, pHrodo™, ацидификация фагосом, перитонеальные фагоциты, лейкоциты крови, миелоциты

DOI: 10.31857/S102872210006497-1

Адрес: 614081, Пермский край, г. Пермь, ул. Голева, 13 «Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН», Шилов Станислав Юрьевич.

Тел. +7(342) 2807442; факс (342) 2809211.

E-mail: stshilov@mail.ru

Авторы:

Шилов С. Ю., к.м.н., м.н.с., «Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук» – филиал ПФИЦ УрО РАН, Пермь, Россия;

Шилов Ю. И., к.м.н., доцент, в.н.с., «Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук» – филиал ПФИЦ УрО РАН, Пермь, Россия;

Туляев Я. А., аспирант, «Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук» – филиал ПФИЦ УрО РАН, Пермь, Россия;

Барков С. Ю., студент медико-профилактического факультета, ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет им. акад. Е. А. Вагнера» Минздрава России, Пермь, Россия.

Для инструментального исследования фагоцитоза и созревания фагосом, сопровождающегося их ацидификацией (снижением рН до 4,0–4,5), на современном этапе используются рН-сенситивные флуоресцентные красители, которые флуоресцируют только при низких значениях рН внутри фагосом, но не светятся при физиологических уровнях рН вне кле-

ток [1, 2]. Наиболее часто используют грамнегативные и грампозитивные бактерии, частицы зимозана, меченые флуорохромами pHrodo™ green (Ex/Em 509/533 нм) и pHrodo™ red (Ex/Em 560/585 нм) [1, 2]. Исследование фагоцитоза с этими флуорохромами возможно методами конфокальной микроскопии, проточной лазерной цитометрии, а при кинетической оценке в режиме реального времени – с помощью современных планшетных флуориметров и планшетных инвертированных микроскопов с серийной съёмкой непосредственно в инкубаторе (Essen Biosciences IncuCyte FLR, IncuCyte Zoom, IncuCyte S3, NanoEnTek JuLI Stage) [2]. Ранее этот подход был адаптирован нами для проточного лазерного цитометра Guava EasyCyte (Millipore) [3].

Цель работы – исследование изменения показателей фагоцитоза с маркером ацидификации фагосом pHrodo™ при зимозановом перитоните у крыс.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования выполнены на самцах белых неинбредных крыс в возрасте 3–6 месяцев.

Для индукции перитонита животным вводили стерильную суспензию зимозана А внутрибрюшинно в дозе 50 мг/кг массы тела. Животных выводили из эксперимента под наркозом. Перитонеальные фагоциты выделяли методом промывания брюшной полости 20 мл среды 199 с добавлением 20 ЕД/мл гепарина. Клетки костного мозга извлекали из бедренной кости методом промывания костномозговой полости 2 мл среды 199. Лейкоциты крови выделяли методом осаждения эритроцитов в 0,1% растворе метилцеллюлозы (Sigma-Aldrich, США). После двукратного отмывания центрифугированием и подсчёта абсолютного числа лейкоцитов в камере Нейбауэра (AC1000 Improved Neubauer, Hawksley, Великобритания) их концентрацию доводили до 25×10^6 клеток в 1 мл в полной питательной среде (ППС) следующего состава: среда RPMI-1640 без L-глутамината с добавлением 2 мМ GlutaMAX™, 1 мМ пирувата натрия, 1% заменимых аминокислот в MEM (все Gibco®, Life technologies™), 10 мМ HEPES (Sigma-Aldrich). В пробирках Эппендорф объёмом 0,2 мл смешивали 88 мкл ППС, 4 мкл суспензии лейкоцитов (25×10^6 клеток/мл) и 8 мкл преинкубированной для опсонизации при 37 °С в течение 30 мин смеси равных объёмов частиц зимозана, меченого зеленым pHrodo™ (100×10^6 частиц/мл; pHrodo™ Green Zymosan Bioparticles™ Conjugate for Phagocytosis, Thermo Fisher Scientific, P35365) и аутоплазмы. Параллельно ставили пробы с неопсонизированными частицами (вместо аутоплазмы вносили ППС), а также негативные контрольные пробы без объектов фагоцитоза (аутофлуоресценция) и без лейкоцитов. Пробу инкубировали при 37 °С в течение 120 мин, после чего пробирки помещали на лед и их содержимое количественно переносили в плоскодонные 96-луночные планшеты (Медполимер, Россия), используя для отмывания и увеличения объёма каждой пробы по 100 мкл охлажденного до 4 °С раствора Версена (Биолот, Россия) с рН, доведенной до 7,4. Анализ интенсивности флуоресценции проводили с помощью планшетного проточного лазерного цитометра Guava EasyCyte (Hayward, CA, США), который непосредственно позволяет оценить абсолютное количество клеток на микролитр без использования эталонных частиц благодаря использованию стандартизированного микрокапилляра и высокоточного микронасоса (The Lee Company, США). Далее данные анализировали в программе Guava CytoSoft 5.3, где в мо-

дулях Guava Express Plus и Guava Express PRO проводили последовательное гейтирование гистограмм, полученных с датчика переднего светорассеяния (Forward Scatter) по количеству флуоресцентных событий по датчику Green Fluorescence. При этом все отгейтированные клетки объективно отражают уровень ацидификации фагосом, так как при физиологических значениях рН вне клетки green pHrodo™ не флуоресцирует, и интенсивность флуоресценции прямо пропорциональна снижению рН до 4,0–4,5 при ацидификации фагосом. Результаты выражали в виде абсолютного числа флуоресцирующих событий на всю брюшную полость для перитонеальных клеток, на костный мозг одной бедренной кости для миелоцитов и на 1 мкл крови, которое отражает общее число клеток с ацидифицированными фагосомами. Статистический анализ проводили с помощью методов описательной статистики и *t*-критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Установлено, что у крыс с 12-часовым зимозановым перитонитом фагоцитарная активность перитонеальных фагоцитов с опсонизированным и неопсонизированным зимозаном статистически значимо выше, чем у интактных самцов крыс. Аналогичные изменения (статистически значимая активация фагоцитоза) отмечаются и при исследовании фагоцитарной активности лейкоцитов крови и клеток костного мозга, что указывает на системный характер активации фагоцитирующих клеток. В связи с тем, что длительность контакта фагоцитов с объектами фагоцитоза *in vitro* в наших экспериментах составляет 120 мин (именно это время требуется для созревания и ацидификации фагосом), статистически значимые различия показателей абсолютного числа светящихся событий в пробах с опсонизированным зимозаном в сравнении с неопсонизированным отсутствуют. С учетом того, что по данным микроскопического анализа, максимальный уровень поглощения зимозана (плато) достигается уже через 30 мин, при инкубации в течение 120 мин фактор влияния лиганд-рецепторной адгезии объектов фагоцитоза к мембране фагоцита становится несущественным. Число светящихся событий в этих условиях отражает количество клеток с фагосомами, подвергшимися ацидификации.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 17-44-590995 и Администрации Пермского края, а также в рамках государствен-

ного задания «ИЭГМ УрО РАН», номер госрегистрации темы: 01201353248.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Zhang R., Kobayashi Y., Kazumura K., Tsuchiya H., Morishita N., Inagawa H., Soma G. Development of an evaluation device for phagocytic activity of new phagocytes using simple and pH-sensitive particles that do not require pre-treatment. *Anticancer Res.* 2016, 36(7), 3613–3618.
2. Kapellos T.S., Taylor L., Lee H., Cowley S.A., James W.S., Iqbal A.J., Greaves D.R. A novel real time imaging platform to quantify macrophage phagocytosis. *Biochemical Pharmacology* 2016, 116, 107–119.
3. Шилов Ю. И., Шилов С. Ю., Жукова А. Е., Барков С. Ю., Петухова А. А. Изменение уровня ацидификации фагосом у крыс в зависимости от фазы эстрального цикла. *Российский иммунологический журнал* 2016, том 10 (19), № 2 (1), 183–184. [Shilov Ju. I., Shilov S. Ju., Zhukova A. E., Barkov S. Ju., Petuhova A. A. Changes in level of phagosomal acidification in rats depending on the phase of the estrous cycle. *Rus. J. Immunol.* 2016, Vol. 10(19), issue 2(1), 183–184.]

CHANGES IN PHAGOCYTOSIS PARAMETERS WITH A MARKER OF PHAGOSOME ACIDIFICATION pHrodo™ UNDER-ZYMOSAN-INDUCED PERITONITIS IN RATS

© 2019 S. Ju. Shilov^{1,2*}, Ju. I. Shilov^{1,2}, Ya. A. Tulyaev¹,
S. Yu. Barkov²

*E-mail: stshilov@mail.ru

¹*Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences* – a branch of the PFRC UB RAS, Perm, Russia;

²*Acad. E. A. Wagner Perm State Medical University, Perm, Russia*

Received: 15.03.2019. Accepted: 28.03.2019

The changes in phagocytosis under 12-hour zymosan-induced peritonitis in rats were investigated using flow laser cytometry using zymosan labeled with pH-sensitive fluoro-chrome green pHrodo™ (Thermo Fisher Scientific). An increase in the absolute parameters of phagocytosis was found in the study of peritoneal exudate cells, blood leukocytes and bone marrow cells in rats with peritonitis in comparison with intact animals.

Key words: zymosan-induced peritonitis, pHrodo™, acidification of phagosomes, peritoneal phagocytes, blood leukocytes, myelocytes

Authors:

Shilov S. Ju., ✉ PhD, MD, Junior Researcher, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms of the UB of the RAS, Perm, Russia. E-mail: stshilov@mail.ru;

Shilov Ju. I., PhD, MD, Associate Professor, Leading Researcher, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms of the UB of the RAS, Perm, Russia;

Tulyaev Ya. A., Aspirant, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms of the UB of the RAS, Perm, Russia;

Barkov S. Yu., Student, Acad. E. A. Wagner Perm State Medical University, Perm, Russia.

ГЛИКОЭРРЕЙ В ИЗУЧЕНИИ ГЛИКАН-БЕЛКОВОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ

© 2019 г. Н. В. Шилова^{1,2,3*}, Н. Р. Хасбиуллина^{1,3,4}, А. Ю. Нокель^{1,3},
М. М. Зиганшина¹, Н. В. Бовин²

*E-mail: pumatnv@gmail.com.

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В. И. Кулакова» Минздрава РФ, Москва, Россия;

²ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова» РАН, Москва, Россия;

³ООО «Семиотик», Москва, Россия;

⁴ФГБУН «Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского» РАН, Москва, Россия

Поступила: 26.02.2019. Принята: 11.03.2019

Представлены возможности гликоэррея – уникального метода для изучения углеводов-связывающих белков, к которым относятся основные компоненты иммунной системы млекопитающих – антитела и лектины. Показано, что эррей является гибким инструментом и может быть направленно изменен для решения широкого круга разнообразных задач как фундаментального, так и прикладного характера.

Ключевые слова: гликоэррей, гликаны, углевод-белковое взаимодействие, лектины, антитела

DOI: 10.31857/S102872210006496-0

Адрес: 117997, г. Москва, ул. Академика Опарина, д. 4, ФГБУ «Национального медицинского исследовательского центра акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В. И. Кулакова», Шилова Надежда Владимировна.
Тел.: 8 916 925 78 95 (моб.).

E-mail: pumatnv@gmail.com

Авторы:

Шилова Н. В., к.х.н., с.н.с. отдела химической биологии гликанов и липидов ФГБУН «Института биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова» РАН; с.н.с. лаборатории клинической иммунологии ФГБУ «Национального медицинского исследовательского центра акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В. И. Кулакова»; главный специалист по микрочипам ООО «Семиотик», Москва, Россия;

Хасбиуллина Н. Р., м.н.с. лаборатории химии углеводов ФГБУН «Института органической химии им. Н. Д. Зелинского»; н.с. лаборатории клинической иммунологии ФГБУ «Национального медицинского исследовательского центра акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В. И. Кулакова»; специалист по микрочипам ООО «Семиотик», Москва, Россия;

Нокель А. Ю., к.х.н., с.н.с. лаборатории клинической иммунологии ФГБУ «Национального медицинского исследовательского центра акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В. И. Кулакова»; главный инженер ООО «Семиотик», Москва, Россия;

Зиганшина М. М., к.б.н., с.н.с. лаборатории клинической иммунологии ФГБУ «Национального медицинского исследовательского центра акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В. И. Кулакова», Москва, Россия;

Бовин Н. В., д.х.н., заведующий отделом химической биологии гликанов и липидов ФГБУН «Института биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова» РАН, Москва, Россия.

Основными белками иммунной системы млекопитающих являются иммуноглобулины. Самыми малоизученными из них остаются естественные антитела (eAT), т.е. антитела, появляющиеся без предварительной иммунизации, уровень которых практически не изменяется на протяжении жизни. Значительную часть пула eAT составляют антитела к гликанам (AGAT). Не менее важными для иммунной системы являются эндогенные лектины – углевод-связывающие белки не иммунной природы.

Исследование специфичности AGAT и лектинов было ограничено из-за недоступности необходимых библиотек углеводовных лигандов. С появлением гликоэррея (PGA, printed glycan array) это стало возможным. Эррей наносится на слайд размером с предметное стекло, результат читается с помощью флуоресцентного ридера. Благодаря PGA было проведено систематическое исследование репертуара AGAT у более 100 доноров [1]. Было установлено, что спектр

АГАТ человека очень широк и может быть разделен на 3 основные группы: 1) консервативные АГАТ, присутствующие в крови практически всех людей и обладающие сходной специфичностью и содержанием; 2) аллоантитела к группоспецифическим антигенам крови и антитела к ксено-антигенам; 3) пластичные антитела, уровень которых может изменяться при различных состояниях организма (болезнь, беременность и т.д.). Происхождение и функции АГАТ остаются пока малоизученными, однако, на основании полученных с помощью PGA данных в сочетании с данными литературы, было сделано предположение, что они могут выполнять надзорную функцию, элиминируя постоянно появляющиеся трансформированные клетки с aberrантным гликозилированием [1]. Было показано, что АГАТ, детектируемые с помощью представительного PGA, являются перспективными маркерами для диагностики сложных системных заболеваний, например, колоректального рака [2] и серьезной патологии беременности – преэклампсии [3] с хорошими показателями чувствительности и специфичности. Так же, с помощью PGA мы показали, что только часть антител сыворотки крови человека способны взаимодействовать с белком системы комплемента, т.е. АГАТ, по-видимому, могут реализовывать надзорную функцию не только по классическим, но и по неканоническим механизмам. Сравнение специфичности АГАТ, выделенных с помощью аффинной хроматографии из сывороток крови человека, с моноклональными антиуглеводными антителами показало, что способность связывать полисахариды наряду с олигосахаридами является, по-видимому, отличительной способностью еАТ. Данное наблюдение согласуется с выдвинутой ранее гипотезой о происхождении еАТ как результата стимуляции их появления микробиотой ЖКТ в первые годы жизни человека [1].

PGA позволяет проводить систематическое изучение специфичности лектинов – весьма представленной в организмах млекопитающих группы белков, входящей в систему как врожденного, так и адаптивного иммунитета. С помощью гликоэррея были исследованы паттерны специфичности галектина-8 – как дикого типа, так и его гомодимера, состоящего из одинаковых N-углевод-связывающих доменов. Наблюдаемые изменения в полученных профилях позво-

лили понять, как можно влиять на функционирование углевод-связывающих доменов этого лектина [4]. Кроме того, мы показали, что с помощью гликоэррея можно изучать специфичность лектинов не только как индивидуальных белков, но и непосредственно на поверхности клетки, например, моноцитов крови человека, бактериальных клеток и клеток ряда клеточных линий, для чего были сконструированы эрреи с заданными свойствами, как, например, PGA с увеличенным размером спотов и более высокой концентрацией лиганда.

Таким образом, гликоэррей является гибким инструментом и может быть использован для решения широкого круга разнообразных задач как фундаментального, так и прикладного характера.

Работа поддержана грантом РФФИ № 18-04-00749.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. *Бовин Н. В.* Естественные антитела к гликанам. Биохимия. 2013, 78(7), 1008. [*Bovin N. V.* Natural antibodies to glycans. Biochemistry (RUS). 2013, 78(7), 1008].
2. *Зиганшина М. М., Шилова Н. В., Хасбиуллина Н. Р., Ракитко А. С., Тютюнник Н. В., Мантрова Д. А., Тютюнник В. Л., Бовин Н. В., Сухих Г. Т.* Спектр и диагностическое значение антигликановых антител, выявляемых при развитии больших акушерских синдромов, связанных с дефектами плацентации. Росс. Аллергол. Журн. 2018, 15(1), 37. [*Ziganshina M. M., Shilova N. V., Khsbiullina N. R., Rakitko A. S., Tyutyunnik N. V., Mantrova D. A., Tyutyunnik V. L., Bovin N. V., Sukhih G. T.* Spectrum and diagnostic value of anti-glycan antibodies detected at big obstetrical syndrome development connected with defects of placentation. Russ. Allerg. J. (RUS) 2018, 15(1), 37.]
3. *Butvilovskaya V. I., Popletaeva S. B., Chechetkin V. R., Zubitsova Z. I., Tsybul'skaya M. V., Samokhina L. O., Vinitskii L. I., Ragimov A. A., Pozharitskaya E. I., Grigor'eva G. A., Meshalkina N. Y., Golysheva S. V., Shilova N. V., Bovin N. V., Zasedatelev A. S., Rubina A. Y.* Multiplex determination of serological signatures in the sera of colorectal cancer patients using hydrogel biochips. Cancer Med. 2016. 5(7), 1361.
4. *Ludwig A. K., Michalak M., Shilova N., André S., Kaltner H., Bovin N. V., Kopitz J., Gabius H. J.* Studying the Structural Significance of Galectin Design by Playing a Modular Puzzle: Homodimer Generation from Human Tandem-Repeat-Type (Heterodimeric) Galectin-8 by Domain Shuffling. Molecules. 2017, 22(9), 1572.

GLYCOARRAYS FOR STUDYING OF GLYCAN-PROTEIN INTERACTION

© 2019 N. V. Shilova^{1,2,3*}, N. R. Khasbiullina^{1,3,4}, A. Yu. Nokel^{1,3},
M. M. Ziganshina¹, N. V. Bovin²

*E-mail: pumatnv@gmail.com.

¹National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after Academician V. I. Kulakov of the Ministry of Healthcare of Russian Federation, Moscow, Russia;

²Federal Budget Institution of Science «M. M. Shemyakin and Yu. A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry», Moscow, Russia;

³Semiotik LLC, Moscow, Russia;

⁴Federal Budget Institution of Science «N. D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry», Moscow, Russia

Received: 26.02.2019. Accepted: 11.03.2019

The capacities of glycoarray – a unique method for investigation of carbohydrate-binding proteins including antibodies and lectins – are presented. It was shown that array is very flexible device and it can be directional changed for solution of a wide range of different tasks of both fundamental and applied nature.

Key words: glycoarray, glycans, glycan-protein interaction, lectins, antibodies

Authors:

Shilova N. V., ✉ PhD, senior scientist of Department of chemical biology of glycans and lipids M. M. Shemyakin and Yu. A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry; senior scientist of laboratory of clinical immunology National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after Academician V. I. Kulakov; chief microchip specialist of Semiotik LLC, Moscow, Russia. E-mail: pumatnv@gmail.com;

Khasbiullina N. R., junior scientist of laboratory of carbohydrate chemistry Zelinsky Institute of Organic Chemistry; staff scientist of laboratory of clinical immunology National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after Academician V. I. Kulakov; microchip specialist of Semiotik LLC, Moscow, Russia;

Nokel A. Yu., PhD, senior scientist of laboratory of clinical immunology National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after Academician V. I. Kulakov; chief engineer of Semiotik LLC, Moscow, Russia;

Ziganshina M. M., PhD, senior scientist of laboratory of clinical immunology Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after Academician V. I. Kulakov, Moscow, Russia;

Bovin N. V., Dr. habil., professor, chief of Department of chemical biology of glycans and lipids M. M. Shemyakin and Yu. A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Moscow, Russia.

РЕГУЛЯТОРНЫЕ CD4⁺ Т-КЛЕТКИ, ВЫДЕЛЕННЫЕ ИЗ ПУЛОВ НАИВНЫХ КЛЕТОК, КЛЕТОК ПАМЯТИ И ЭФФЕКТОРНЫХ ЛИМФОЦИТОВ, СОХРАНЯЮТ СВОЙСТВА СВОИХ СУБПОПУЛЯЦИЙ

© 2019 г. К. В. Шмагель

E-mail: shmagel@iegm.ru

«Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук» – филиал ПФИЦ, Пермь, Россия

Поступила: 13.03.2019. Принята: 26.03.2019

В группе здоровых добровольцев методом проточной цитометрии определяли субпопуляционный состав CD4⁺ Т-лимфоцитов: наивные клетки, клетки центральной и эффекторной памяти, терминально дифференцированные эффекторы. Внутри каждой субпопуляции по маркерам CD25, CD127, FoxP3 идентифицировали регуляторные Т-лимфоциты (Tregs). Экспрессию CD71, CD39, GARP, LAP, транскрипционного коактиватора PGC-1 α , регулирующего энергетический метаболизм, а также массу и заряд митохондрий оценивали, как в общем пуле клеток каждой субпопуляции, так и в пуле Tregs, выделенных внутри этих субпопуляций. Проведенный корреляционный анализ показал, что активационный фенотип Tregs отражает таковой в общем пуле клеток родственной им субпопуляции. Также были установлены сильные связи показателей энергетики Tregs с энергетическими параметрами соответствующих субпопуляций.

Ключевые слова: CD4⁺ Т-лимфоциты, регуляторные Т-клетки, субпопуляции, активация, митохондрии, энергетика

DOI: 10.31857/S102872210006495-9

Адрес: 614081 г. Пермь, ул. Голева, д. 13, «Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук» – филиал ПФИЦ, лаборатория экологической иммунологии. Шмагель Константин Владимирович. Тел.: 8 (342) 280 83 34.

E-mail: shmagel@iegm.ru

Авторы:

Шмагель К. В., д.м.н., заведующий лабораторией экологической иммунологии «Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук» – филиал ПФИЦ, Пермь, Россия.

Регуляторные Т-лимфоциты (Tregs) играют важную роль в работе иммунной системы. Они контролируют активацию и пролиферацию иммунокомпетентных клеток, препятствуя, таким образом, развитию аутоиммунных и иммунопатологических процессов. Изначально человеческие Tregs характеризовались как CD4⁺ Т-клетки с высоким уровнем экспрессии рецептора к IL-2 (CD25) и низким содержанием рецептора к IL-7 (CD127). Однако к настоящему времени стало ясно, что популяция регуляторных клеток

высоко гетерогенна [1]. Элементы, способные подавлять активность других клеток присутствуют не только среди CD4⁺ Т-лимфоцитов, но и среди CD8⁺ Т-клеток, $\gamma\delta$ Т-клеток, В-лимфоцитов. В то же время, CD4⁺ Tregs занимают лидирующее положение в подавлении аутоиммунных, аллергических и воспалительных реакций. Эксперименты с тимэктомией, проведенной в неонатальном периоде, показали, что тимус является важным источником CD4⁺ Tregs [2]. Кроме того, было установлено, что регуляторные Т-лимфоциты могут генерироваться вне тимуса. В результате CD4⁺ Tregs были разделены на тимические (tTregs) и периферические (pTregs) [3]. Эти субпопуляции отличаются между собой по фенотипическим маркерам, регуляции и выполняемым функциям. Первые несут маркер CD45RA, вторые – CD45R0. Тимические Tregs направлены преимущественно на блокирование негативных аутоиммунных и воспалительных реакций. Они распознают аутоантигены pTregs обеспечивают толерантность во

взаимоотношениях «мать-плод», контролируют реакции против вирусов, бактерий, паразитов и пересаженных чужеродных тканей. Их рецепторы реагируют на чужеродные пептиды.

Вместе с тем, основная масса Т-лимфоцитов после выхода из тимуса проходит несколько стадий развития: наивные клетки, клетки центральной и эффекторной памяти, терминально дифференцированные эффекторы. Все эти субпопуляции содержат в своем составе Tregs.

Целью настоящего исследования была оценка свойств CD4⁺ Tregs, выделенных из различных субпопуляций периферических CD4⁺ Т-лимфоцитов человека.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Мононуклеарные клетки периферической крови были получены от 23 здоровых добровольцев (15 женщин и 8 мужчин) в возрасте 32 лет (медиана; интерквартильный размах: 28–39 лет). Жизнеспособные клетки делили пополам и окрашивали двумя наборами антител. В первом варианте использовали митохондриальные красители MitoTracker™ Green FM и MitoTracker™ Orange CM-H2TMRos (Invitrogen, США), и коктейль антител для поверхностного окрашивания, содержащий анти-CD25-BUV395, анти-CD127-BV786, анти-CD39-BV711, анти-CD71-BV421, анти-CD3-AF700, (Becton Dickinson, США), анти-CD45RA-BV650, анти-GARP-PE-Cy7, анти-LAP-APC (Biolegend, США), анти-CD4-Qdot605 и LIVE/DEAD® Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit (Invitrogen, США). Во втором варианте добавляли коктейль антител, содержащий анти-CD25-BUV395, анти-CD127-BV786, анти-CD39-BV711, анти-CD71-BV421, анти-CCR7-PE-Cy7, анти-CD3-AF700 (Becton Dickinson, США), анти-CD45RA-BV650 (Biolegend, США), анти-CD4-Qdot605 и LIVE/DEAD® Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit (Invitrogen, США). После инкубации, отмывания и фиксации/пермеабиллизации клетки окрашивали анти-PGC1α-FITC (Novus Biologicals, Великобритания) и анти-FoxP3-PE (eBioscience™, США) Измерение проводили на проточном цитофлюориметре Fortessa (Becton Dickinson, США).

В пуле мононуклеарных клеток периферической крови определяли: наивные Т-лимфоциты (CD3⁺CD4⁺CD45RA⁺CCR7⁺), Т-клетки центральной памяти (CD3⁺CD4⁺CD45RA⁺CCR7⁺) – СМ, Т-клетки эффекторной памяти (CD3⁺CD4⁺CD45RA⁺CCR7⁻) – ЕМ и терминально дифферен-

цированные лимфоциты (CD3⁺CD4⁺CD45RA⁺CCR7⁻) – ТD.

РЕЗУЛЬТАТЫ

У здоровых лиц абсолютное содержание CD4⁺ Т-клеток крови распределилось следующим образом: наивные – 429/мкл; СМ – 304/мкл; ЕМ – 190/мкл; ТD – 14/мкл. Численность Tregs в тех же субпопуляциях: наивные – 18/мкл; СМ – 18/мкл; ЕМ – 16/мкл; ТD – 1,4/мкл. Относительное содержание CD4⁺FoxP3⁺ Tregs в популяциях оказалось следующим: наивные – 4,2%; СМ – 6,0%; ЕМ – 8,6%; ТD – 10,1%. Таким образом, абсолютная численность CD4⁺ Tregs в трех субпопуляциях CD4⁺ Т-клеток (наивных, СМ и ЕМ) у взрослых здоровых людей находится приблизительно на одном уровне. В пуле эффекторных CD4⁺ Т-лимфоцитов она снижена более, чем в 10 раз. При этом относительное содержание Tregs растет в процессе антиген-зависимой дифференцировки CD4⁺ Т-клеток.

Известно, что активность Tregs зависит от экспрессии целого ряда поверхностных и внутренних структур, определяющих супрессорный потенциал этих клеток. Среди них: трансферинный рецептор CD71, отражающий вхождение в пролиферацию; GARP/LAP комплекс, индуцирующий секрецию TGF-β; CD39 и CD73, редуцирующие внеклеточные молекулы АТФ и АДФ до АМФ (CD39) и АМФ до аденозина (CD73). Последнее ведет к подавлению продукции провоспалительных цитокинов эффекторными клетками и стабилизации функции самих Tregs.

Мы установили, что комплекс GARP/LAP экспрессируется как на CD4⁺ Tregs, так и на других CD4⁺ Т-лимфоцитах. Относительное содержание GARP/LAP-позитивных элементов среди CD4⁺ Tregs составило 3,7%, среди всего пула CD4⁺ Т-клеток – 2,3%. Меньше всего клеток, экспрессирующих GARP/LAP было среди наивных лимфоцитов: 2,3% и 1,5% соответственно. Из всех CD4⁺ Т-клеток памяти GARP/LAP определялся у 3,7%, а из всех CD4⁺CD45RA⁻ Tregs – у 5,9%. Таким образом, у CD4⁺ Tregs экспрессия комплекса, индуцирующего секрецию TGF-β, соответствует уровню его экспрессии в той субпопуляции CD4⁺ Т-клеток, из которой Tregs были выделены. Подтверждением этому стали результаты корреляционного анализа. Связь между уровнем GARP/LAP-позитивных CD4⁺ Т-лимфоцитов и GARP/LAP-позитивных CD4⁺ Tregs была сильной и статистически вы-

соко значимой. Эта зависимость была установлена для общей популяции CD4⁺ Т-клеток, для наивной субпопуляции и субпопуляции клеток памяти. Во всех случаях коэффициент корреляции (R) был выше 0,850; $p < 0,001$.

Аналогичные результаты были получены по экспрессии CD71. CD4⁺ Т-клетки памяти содержали в своем составе больше лимфоцитов с маркером CD71, чем наивные CD4⁺ Т-клетки. При этом Tregs, выделенные из любой субпопуляции (наивных, CM, EM и TD) содержали больше CD71-позитивных элементов, чем другие клетки. Для каждой из этих субпопуляций вновь были установлены статистически значимые позитивные связи между содержанием CD71-экспрессирующих элементов среди всех CD4⁺ Т-клеток и среди CD4⁺ Tregs. Во всех случаях $R > 0,699$; $P < 0,001$. При исследовании экспрессии CD39 обнаружилось, что этот маркер, в отличие от CD71, шире представлен на наивных CD4⁺ Т-клетках по сравнению с CD4⁺ Т-клетками памяти. Однако вновь самая большая доля CD39-позитивных лимфоцитов во всех субпопуляциях наблюдалась среди Tregs. При этом прямые зависимости между экспрессией CD39 в общем пуле клеток и в пуле Tregs были характерны для всех четырех субпопуляций (от $R > 0,629$ ($P < 0,01$) до $R > 0,860$ ($P < 0,001$)).

Концентрация PGC-1 α была относительно низкой в наивных CD4⁺ Т-клетках, а наиболее высокой в CD4⁺ Т-клетках эффекторной памяти. Внутриклеточное содержание этого транскрипционного коактиватора оказалось единственным параметром, уровень которого в общем пуле CD4⁺ Т-лимфоцитов был выше, чем пуле CD4⁺ Tregs. Это различие отмечено всех четырех субпопуляций. Вместе с тем, выраженность экспрессии PGC-1 α в общем пуле CD4⁺ Т-клеток

и в пуле CD4⁺ Tregs была сопряжена, а R в каждой из субпопуляций превышал 0,730 ($P < 0,001$). Известно, что PGC-1 α активирует работу митохондрий, а также запускает их регенерацию [4]. Исходя из этого, можно было бы ожидать меньшую активность этих органелл у Tregs в сравнении с таковой в общем пуле CD4⁺ Т-лимфоцитов. Однако обнаружилось, что и масса, и заряд митохондрий у CD4⁺ Tregs были выше, чем у CD4⁺ Т-клеток общего пула. Это характерно и для наивных элементов, и для клеток памяти. Более того, мы установили, что параметры митохондрий Tregs жестко коррелировали с параметрами митохондрий CD4⁺ Т-лимфоцитов общего пула.

Таким образом, нами впервые представлены данные о том, что у здоровых людей CD4⁺ Tregs, выделенные из разных субпопуляций CD4⁺ Т-лимфоцитов не только функционально связаны с состоянием этих субпопуляций, но и превосходят CD4⁺ Т-клетки «материнского» пула по активационным и энергетическим параметрам.

Работа выполнена в рамках государственного задания; номер госрегистрации темы: 01201353249.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Lu L., Barbi J., Pan F. The regulation of immune tolerance by FOXP3. *Nat. Rev. Immunol.* 2017, 17(11), 703–717.
2. Nishizuka Y. & Sakakura T. Thymus and reproduction: sex-linked dysgenesis of the gonad after neonatal thymectomy in mice. *Science.* 1969, 166, 753–755.
3. Plitas G. & Rudensky A. Y. Regulatory T cells: differentiation and function. *Cancer Immunol. Res.* 2016, 4(9), 721–725.
4. Wenz T. PGC-1 α activation as a therapeutic approach in mitochondrial disease. *IUBMB Life.* 2009, 61(11), 1051–1062.

**REGULATORY CD4⁺ T CELLS ISOLATED FROM NAIVE, MEMORY
AND EFFECTOR LYMPHOCYTE SUBSETS KEEP THE PROPERTIES
OF APPROPRIATE SUBPOPULATIONS**

© 2019 K. V. Shmagel

E-mail: shmagel@iegm.ru

*Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms Ural Branch
of the Russian Academy of Sciences, Perm, Russia*

Received: 13.03.2019. **Accepted:** 26.03.2019

In the blood of healthy volunteers, CD4⁺ T-lymphocyte subsets (naïve cells, central and effector memory cells, terminally differentiated effectors) were determined by flow cytometry. Using CD25, CD127, and FoxP3 molecules, regulatory T-lymphocytes (Tregs) were identified within each subset. Mitochondrial mass and charge, as well as the expression of CD71, CD39, GARP, LAP, and transcriptional co-activator PGC-1 α regulating energy metabolism were assessed within each subset's total cell pool and Tregs isolated from the appropriate subset. Correlation analysis showed that the Treg activation phenotype reflects the one of the parent subset. Furthermore, strong links between the energy indices of Tregs and the appropriate T-cell subset were established.

Key words: CD4⁺ T-lymphocytes, regulatory T-cells, subsets, activation, mitochondria, energy

Author:

Shmagel K. V., PhD, Head of the Laboratory of Ecological Immunology at the Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Perm, Russia.

ВЗАИМОСВЯЗЬ ИММУННЫХ И МЕТАБОЛИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ ИШЕМИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА

© 2019 г. А. А. Шульгинова*, Г. Н. Рыжикова, И. И. Коломоец, В. А. Рагулина

*E-mail: snaky292@yandex.ru

ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет»
Минздрава РФ, Курск, Россия

Поступила: 24.02.2019. Принята: 12.03.2019

В исследование было включено 104 пациента, госпитализированных в неврологическое отделение БМУ «Курская областная клиническая больница» с хронической ишемией мозга (ХИМ) на фоне гипертонической болезни II стадии, разделенных поровну по I и II стадии заболевания. В крови (плазма, нейтрофилы и эритроциты) определяли параметры иммунного и метаболического статуса с оценкой взаимосвязей между изученными показателями. У пациентов с ХИМ I и II стадии установлено, что достоверных взаимосвязей больше у пациентов с ранней стадией заболевания (30) по сравнению с таковыми у пациентов с ХИМ II стадии, что, вероятно, свидетельствует о большей дезадаптации механизмов поддержания иммунного и метаболического гомеостаза у пациентов с ХИМ II стадии, по сравнению с больными I стадией болезни.

Ключевые слова: хроническая ишемия мозга, взаимосвязь иммунных и метаболических параметров

DOI: 10.31857/S102872210006494-8

Адрес: 305041, г. Курск, ул. К. Маркса, 3, ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» Минздрава России, кафедра неврологии и нейрохирургии, Шульгинова Анастасия Александровна. Тел.: 8951 33871 16 (моб.).
E-mail: snaky292@yandex.ru

Авторы:

Шульгинова А. А., к.м.н., ассистент кафедры неврологии и нейрохирургии ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» Минздрава России, Курск, Россия;

Рыжикова Г. Н., к.б.н., старший преподаватель кафедры биологической химии ФПО ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» Минздрава России, Курск, Россия;

Коломоец И. И., к.фарм.н., ассистент кафедры биологической химии ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» Минздрава России, Курск, Россия;

Рагулина В. А., к.б.н., доцент кафедры биохимии ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» Минздрава России, Курск, Россия.

Особо актуальным является поиск взаимосвязей между лабораторными показателями и выраженностью клинических проявлений при хронической ишемии головного мозга с последующим поиском наиболее информативных

показателей для своевременной оценки тяжести заболевания и прогнозировании исхода [1–4].

В этой связи целью исследования стало определение взаимосвязей между параметрами иммунного и метаболического статуса у пациентов с хронической ишемией головного мозга I–II стадии до лечения.

ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ МЕТОДЫ

В исследование были включены 104 пациента, госпитализированных в неврологическое отделение БМУ «Курская областная клиническая больница» с хронической ишемией мозга (ХИМ) на фоне гипертонической болезни II стадии, разделенных поровну по I и II стадии заболевания. Оценку лабораторных данных осуществляли до начала лечения. Получали плазму периферической крови и эритроцитарную массу, где определяли сорбционную способность эритроцитов (ССЭ) и сорбционную емкость гликокаликса (СЕГ). В плазме крови и эритроцитах выявляли содержание ацилгидроперекисей

и малонового диальдегида (АГП, МДА), общую антиокислительную активность (ОАА), активность супероксиддисмутазы (СОД), и каталазы. В плазме определяли уровень стабильных метаболитов оксида азота (СМОН), неоптерина, эндотелина-1 (ЭДТ-1), эритропоэтина (ЭП), церулоплазмина (ЦП) и С-реактивного белка (СРБ). Цитокины (TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IFN γ , IL-2, IL-17, IL-18, G-CSF, IL-4, IL-10, IL-1RA) выявляли методом ИФА с использованием наборов ЗАО «Вектор-Бест» (Россия), компоненты системы комплемента (C₃, C_{3a}, C₄, C₅, C_{5a}) и фактор Н – диагностическим набором ООО «Цитокин» (Россия). Активность C₁-ингибитора определяли хромогенным методом. Фагоцитарную активность нейтрофилов оценивали, определяя фагоцитарный индекс (ФИ), фагоцитарное число (ФЧ) и индекс активности фагоцитоза (ИАФ), активность кислород-зависимых систем фотометрически по реакции восстановления нитросинего тетразолия (НСТ-тест), спонтанного и стимулированного зимозаном (НСТ-сп., НСТ-ст.), индексу стимуляции и функциональному резерву нейтрофилов (ИСН, ФРН). Взаимосвязи между исследованными лабораторными параметрами устанавливали на основании факторного анализа, кластерного анализа и коэффициента ранговой корреляции.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

У пациентов с ХИМ I стадии установлены следующие достоверные взаимосвязи между изученными показателями иммунного и метаболического статусов на системном уровне между: МДА и IL-10 ($r=0,60$); МДА и фактор Н ($r= -0,60$); ОАА и IL-1RA ($r= -0,64$); СОД и IL-6 ($r=0,71$); СОД и IL-8 ($r= -0,74$); СОД и C₁-инг. ($r= -0,62$); каталаза и IL-1RA ($r=0,64$); каталаза и C₅ ($r= -0,65$); каталаза и фактор Н ($r= -0,62$); каталаза и НСТ-сп. ($r= -0,70$); каталаза и НСТ-ст. ($r= -0,66$); ЦП и IL-2 ($r=0,64$); ЦП и НСТ-сп. ($r=0,65$); неоптерин и фактор Н ($r= -0,62$); ЭНД-1 и IL-10 ($r=0,82$); СРБ и фактор Н ($r= -0,74$); СРБ и НСТ-сп. ($r= -0,67$). У больных с I стадией ХИМ определены достоверные взаимосвязи между показателями иммунного статуса и метаболического статуса эритроцитов между: МДА и IL-10 ($r= -0,64$); АГП и IL-2 ($r=0,69$); АГП и C₃ ($r= -0,65$); каталаза и C₃ ($r=0,72$); СМОН и C₅ ($r=0,63$); СЕГ и TNF α ($r=0,64$); ССЭ и C₅ ($r= -0,70$). У пациентов со

II стадией заболевания установлены следующие достоверные взаимосвязи между изученными показателями иммунного и метаболического статусов на системном уровне между АГП и IFN γ ($r= -0,72$); АГП и НСТ-сп. ($r= -0,69$); СОД и IL-10 ($r= -0,60$); каталаза и IL-17 ($r=0,60$); ЦП и C₃ ($r=0,65$); неоптерин и ФЧ ($r= -0,74$); ЭДТ-1 и фактор Н ($r=0,60$); СРБ и IL-2 ($r=0,68$); СМ_{ОН} и IL-10 ($r= -0,61$); СМ_{ОН} и C_{5a} ($r= -0,72$). У больных ХИМ II стадии определены достоверные взаимосвязи между показателями иммунного статуса и метаболического статуса эритроцитов: между АГП и IFN γ ($r= -0,72$); АГП и НСТ-сп. ($r=0,69$); СОД и IL-10 ($r= -0,60$); каталаза и IL-17 ($r=0,60$); СМ_{ОН} и C₃ ($r=0,65$); СЕГ и ФЧ ($r= -0,74$); ССЭ и фактором Н ($r=0,60$). Оценивая сумму взаимосвязей между изученными показателями иммунного и метаболического статусов у пациентов с ХИМ I и II стадии нами установлено, что достоверных взаимосвязей больше у пациентов с ранней стадией заболевания (30) по сравнению с таковыми у пациентов с ХИМ II стадии, что, вероятно, свидетельствует о большей дезадаптации механизмов поддержания иммунного и метаболического гомеостаза у пациентов с ХИМ II стадии, по сравнению с больными I стадией болезни.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Гусев Е. И., Чуканова А. С. Современные патогенетические аспекты формирования хронической ишемии мозга. Журнал неврологии и психиатрии, 2015, 3, 4–8. [Gusev E. I., Chukanova A. S. Modern pathogenetic aspects of the formation of chronic cerebral ischemia. Journal of Neurology and Psychiatry, 2015, 3, 4–8].
2. Гаврилюк Е. В., Конопля А. И., Караулов А. В. Роль иммунных нарушений в патогенезе артериальной гипертонии. Иммунология, 2016, 37 (1), 29–34. [Gavrilyuk E. V., Konoplya A. I., Karaulov A. V. The role of immune disorders in the pathogenesis of arterial hypertension. Immunology, 2016, 37 (1), 29–34].
3. Земской А. М. Клиническая иммунология и аллергология. Воронеж 2016, 288. [Zemskov A. M. Clinical immunology and allergology. Voronezh 2016, 288].
4. Конопля А. И., Шатохин М. Н., Маврин М. Ю., Гаврилюк В. П. Взаимосвязь иммунных и оксидантных нарушений при остром обструктивном и необструктивном пиелонефрите. Клиническая медицина, 2017, 95 (4), 362–368. [Konoplya A. I., Shatokhin M. N., Mavrin M. Yu., Gavrilyuk V. P. The relationship of immune and oxidative disorders in acute obstructive and non-obstructive pyelonephritis. Clinical Medicine, 2017, 95 (4), 362–368.].

RELATIONSHIP OF IMMUNE AND METABOLIC DISORDERS IN CHRONIC ISCHEMIA OF THE BRAIN

© 2019 A. A. Shulginova*, G. N. Ryzhikova, I. I. Colomoets,
V. A. Ragulina

*E-mail: snaky292@yandex.ru
Kursk State Medical University, Kursk, Russia

Received: 24.02.2019. Accepted: 12.03.2019

The study included 104 patients hospitalized in the neurological department of the Kursk Regional Clinical Hospital with chronic cerebral ischemia (CCI) against the background of hypertension of the II stage, equally divided by the I and II stages of the disease. In the blood (plasma, neutrophils and erythrocytes), the parameters of the immune and metabolic status were determined with an assessment of the relationship between the studied parameters. In patients with CCI stage I and stage II it is established that there are more reliable interrelations in patients with early stage of the disease compared with those in patients with stage II, and this probably indicates a greater disadaptation of the mechanisms for maintaining immune and metabolic homeostasis in patients with CCI stage II, compared with patients with stage I disease.

Key words: chronic cerebral ischemia, interrelation of immune and metabolic parameters

Authors:

Shulginova A. A., ✉ Ph.D., Assistant of the Department of Neurology and Neurosurgery of Kursk State Medical University, Kursk, Russia. E-mail: snaky292@yandex.ru;

Ryzhikova G. N., Ph.D., Senior Lecturer, Department of Biological Chemistry of Kursk State Medical University, Kursk, Russia;

Kolomoets I. I., Ph.D., Assistant of the Department of Biological Chemistry of Kursk State Medical University, Kursk, Russia;

Ragulina V. A., PdH, assistant of professor «Kursk State Medical University» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Kursk, Russia.

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОДУКЦИИ MMP-9 и TIMP-1 РАЗЛИЧНЫМИ ПОДТИПАМИ МАКРОФАГОВ

© 2019 г. А. А. Янковская, Л. В. Сахно, Е. Я. Шевела

E-mail: shevelak@mail.ru

ФГБНУ «НИИ фундаментальной и клинической иммунологии»,
Новосибирск, Россия

Поступила: 15.03.2019. Принята: 27.03.2019

В работе приведена сравнительная характеристика продукции MMP-9 и TIMP-1 различными подтипами макрофагов (Мф), дифференцированными в присутствии ГМ-КСФ и поляризованными в М1, М2а и М2с клетки. Было показано, что все исследуемые подтипы Мф продуцировали как MMP-9, так и TIMP-1. В то же время соотношение MMP-9/TIMP-1 было достоверно выше у М2с Мф по сравнению с М1 и М2а, что может указывать на важную роль М2с макрофагов в процессах ремоделирования и ограничения фиброза.

Ключевые слова: макрофаги, металлопротеиназа-9 (MMP-9), тканевой ингибитор металлопротеиназ-1 (TIMP-1)

DOI: 10.31857/S102872210006493-7

Адрес: 630091 Новосибирск, ул. Ядринцевская 14 ФГБНУ «НИИ фундаментальной и клинической иммунологии», лаборатория клеточной иммунотерапии, Янковская Александра Александровна. Тел./факс: +7(383) 2282101

E-mail: shevelak@mail.ru

Авторы:

Янковская А. А., аспирант лаборатории клеточной иммунотерапии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», Новосибирск, Россия;

Сахно Л. В., к.б.н., старший научный сотрудник, лаборатория клеточной иммунотерапии, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», Новосибирск, Россия;

Шевела Е. Я., д.м.н., ведущий научный сотрудник, лаборатория клеточной иммунотерапии, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», Новосибирск, Россия.

ВВЕДЕНИЕ

Макрофаги (Мф) играют важную роль в фиброгенезе. Одним из механизмов, которыми они опосредуют свои анти- и профибротические свойства, является продукция металлопротеиназ (MMPs) и их тканевых ингибиторов (TIMPs) [1]. Однако данные о продукции MMPs и TIMPs различными подтипами Мф немногочисленны и противоречивы.

Целью данной работы явилась сравнительная характеристика М1, М2а и М2с Мф по продукции MMP-9 и TIMP-1.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование были включены 9 здоровых доноров в возрасте 22–49 лет. Макрофаги получали из адгезивной фракции мононуклеарных клеток (МНК) периферической крови доноров путем культивирования в обогащенной среде RPMI-1640 в присутствии 50 нг/мл ГМ-КСФ с добавлением 10% сыворотки плодов коровы в течение 7 дней. Поляризирующие стимулы (10 мкг/мл LPS для М1, 20 нг/мл IL-4 для М2а, 50 нг/мл дексаметазона (Dex) для М2с) добавляли на 5-й день. Уровень продукции MMP-9 и TIMP-1 определялся в 7-суточных супернатантах Мф с использованием соответствующих ELISA kit (R&D Systems Inc., USA) в соответствии с инструкцией производителя. Статистическую обработку данных проводили при помощи программного обеспечения STATISTICA 6.0. Полученные результаты представлены в виде медианных значений (Me) с указанием интерквартильных диапазонов (IQR); различия считались значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Анализ содержания MMP-9 в супернатантах, полученных от различных подтипов ГМ-КСФ-дифференцированных Мф, показал, что уровень MMP-9 в культурах М2а и М2с макрофагов пре-

вышал таковой в культурах М1 (4,3 нг/мл, IQR 3,5–6,1). При этом наибольшее содержание MMP-9 выявлялось в культурах М2а (5,5 нг/мл, IQR 3,9–7,4), а М2с продуцировали сопоставимые количества MMP-9 (5,2 нг/мл, IQR 3,8–7,2) ($p > 0.05$).

Уровень TIMP-1 был максимальным в культурах М2а (0,67 нг/мл, IQR 0,28–0,68) и сопоставимым – в культурах М1 Мф (0,62 нг/мл, IQR 0,47–1,05), в то время как М2с Мф отличались наименьшей продукцией (0,49 нг/мл, IQR 0,09–0,74) ($p > 0.05$).

Анализ соотношения MMP-9/TIMP-1 показал, что наибольшие значения MMP-9/TIMP-1 были характерны для М2с Мф (9,7; IQR 4,7–43,1), в то время как М1 и М2а Мф отличались достоверно наименьшими значениями: 7,42 (IQR 3,6–7,2) для М1 ($p = 0,045$) и 9,0 (IQR 4,2–16,8) для М2а ($p = 0,045$).

MMPs отвечают за разрезание компонентов внеклеточного матрикса, преимущественно, коллагена, а TIMPs, связываясь с активными сайтами MMPs, ингибируют их действие. Баланс этих молекул в организме регулирует процессы синтеза и деградации соединительной ткани, а его нарушение может приводить к развитию фиброза – избыточной продукции и отложению

внеклеточного матрикса [2]. В настоящем исследовании показано, что все исследуемые подтипы GM-CSF-дифференцированных Мф (М1, М2а, М2с) способны к продукции как MMP-9, так и TIMP-1, то есть проявляют как про-, так и антифибротическую активность. В то же время М2с Мф отличались наименьшей продукцией TIMP-1 и, соответственно, наибольшим значением соотношения MMP-9/TIMP-1. Считается, что М2с Мф появляются преимущественно на последней стадии физиологической репарации тканей (фазе ремоделирования) [3], поэтому значительное преобладание MMP-9 над TIMP-1 может говорить о способности этих клеток ограничивать процесс фиброза, препятствуя тем самым развитию патологической репарации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Braga T., Agudelo J., Camara N. Macrophages During the Fibrotic Process: M2 as Friend and Foe. *Front Immunol.* 2015, 25; 6, 602.
2. Robert S., Gicquel T., Victoni T., Valença S., Barreto E., Bailly-Maitre B, Boichot E., Lagente V. Involvement of matrix metalloproteinases (MMPs) and inflammasome pathway in molecular mechanisms of fibrosis. *Biosci Rep.* 2016, 36, 4; e00360.
3. Gensel J. C., Zhang B. Macrophage activation and its role in repair and pathology after spinal cord injury. *Brain Res.* 2015, 4; 1619, 1–11.

COMPARATIVE CHARACTERIZATION OF MMP-9 AND TIMP-1 PRODUCTION BY DIFFERENT MACROPHAGES SUBSETS

© 2019 А. А. Янковская, Л. В. Сакхно, Е. Я. Шевила

E-mail: shevelak@mail.ru

Federal Budget Institution of Science «Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology», Novosibirsk, Russia

Received: 15.03.2019. **Accepted:** 27.03.2019

The paper presents a comparative characterization of the MMP-9 and TIMP-1 production by various subsets of macrophages (Mφ) differentiated in the presence of GM-CSF and polarized into M1, M2a and M2c cells. It was shown that all the studied Mφ subtypes produced both MMP-9 and TIMP-1. At the same time, the MMP-9 / TIMP-1 ratio was significantly higher in M2c Mφ compared to M1 and M2a, which may indicate the important role of M2c macrophages during tissue remodeling and restriction of fibrosis.

Key words: macrophages, metalloproteinase-9 (MMP-9), tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1)

Authors:

Янковская А. А., ✉ graduate student of the Laboratory of Cellular Immunotherapy Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russia. **E-mail:** shevelak@mail.ru;

Сакхно Л. В., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russia;

Шевила Е. Я., PhD, MD (Medicine), Leading Research Associate, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russia.

Раздел 3

ВАКЦИНОПРОФИЛАКТИКА

ИССЛЕДОВАНИЕ ИММУНОГЕННОСТИ ДНК-ВАКЦИННЫХ КОНСТРУКЦИЙ, КОДИРУЮЩИХ ЦИТОТОКСИЧЕСКИЕ И Т-ХЕЛПЕРНЫЕ ЭПИТОПЫ ВИРУСА ЭБОЛА

© 2019 г. С. И. Бажан*, Д. В. Антонец, С. Г. Дудко,
О. Н. Каплина, Л. И. Карпенко, А. А. Ильичёв

*E-mail: bazhan@vector.nsc.ru

ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»
Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Новосибирская обл., Россия

Поступила: 15.03.2019. Принята: 29.03.2019

Отсутствие эффективных вакцин против вируса Эбола инициирует поиск новых подходов к решению этой проблемы. Одним из перспективных направлений в разработке противовирусных вакцин является конструирование ДНК-вакцин, кодирующих искусственные полиэпитопные иммуногены. Ранее с использованием оригинального программного обеспечения мы провели дизайн двух полиэпитопных Т-клеточных иммуногенов, содержащих цитотоксические и Т-хелперные эпитопы вируса Эбола и показали, что созданные на их основе ДНК-вакцинные конструкции обеспечивают синтез целевых мРНК и белков в культуре эукариотических клеток. В рамках данной работы мы показали, что спроектированные ДНК-вакцинные конструкции индуцируют вирус-специфические ответы CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов у иммунизированных мышей.

Ключевые слова: вирус Эбола, полиэпитопные Т-клеточные антигены, ДНК-вакцины, иммуногенность

DOI: 10.31857/S102872210006492-6

Адрес: 630559, Новосибирская область, р.п. Кольцово, ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Бажан С. И.
Тел.: 8 (383) 363-47-10, 8 913913 2697 (моб.).

E-mail: bazhan@vector.nsc.ru

Авторы:

Бажан С. И., д.б.н., заведующий теоретического отдела ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово Новосибирская область, Россия;

Антонец Д. В., к.б.н., с.н.с. теоретического отдела ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово Новосибирская область, Россия;

Дудко С. Г., стажер-исследователь отдела биоинженерии ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово Новосибирская область, Россия;

Каплина О. Н., с.н.с. отдела биоинженерии ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово Новосибирская область, Россия;

Карпенко Л. И., д.б.н., заведующая лабораторией рекомбинантных вакцин отдела биоинженерии ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово Новосибирская область, Россия;

Ильичев А. А., д.б.н., заведующий отделом биоинженерии ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово Новосибирская область, Россия.

АКТУАЛЬНОСТЬ И ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Лихорадка Эбола или болезнь, вызванная вирусом Эбола (БВВЭ), – это острое заболевание,

сопровожающееся высоким уровнем летальности. Возбудителем заболевания являются РНК-содержащие вирусы, принадлежащие к семейству *Filoviridae*, род *Ebolavirus*. Первые вспышки БВВЭ были зарегистрированы в 1976 г. сначала в Заире и почти одновременно в Судане, после чего в странах Центральной Африки происходили спорадические вспышки, которые удавалось оперативно ликвидировать. Вспышка БВВЭ в западной Африке в 2014–2015 гг. оказалась на порядок более масштабной, что способствовало принятию мер по противодействию этой инфекции, в том числе направленных на разработку профилактических вакцин. Существует множество подходов к созданию вакцин против вируса Эбола, включая ДНК-вакцины, субъединичные вакцины, а также вакцины на основе реплицирующихся и нереплицирующихся вирусных векторов. Одним из перспективных направлений в разработке противовирусных вакцин является конструирование ДНК-вакцин, кодирующих искусственные полиэпитопные иммуногены. Такие вакцины представляют собой комбинацию эпитопов из

разных вирусных белков и объединенных в составе одной молекулы. Ранее с использованием оригинального программного обеспечения TEpredict/PolyCTLDesigner мы провели дизайн двух полиэпитопных Т-клеточных иммуногенов EV.CTL и EV.Th, содержащих цитотоксические (CTL) и Т-хелперные эпитопы (Th) белков вируса Эбола [1]. Гены, кодирующие спроектированные антигены, были клонированы в эукариотическом векторе pcDNA3.1. Мы показали, что полученные рекомбинантные плазмиды pEV.CTL и pEV.Th – кандидаты ДНК-вакцины против вируса Эбола – обеспечивают синтез целевых мРНК и белков в культуре эукариотических клеток.

Целью настоящей работы явилось изучение способности полученных ДНК-вакцинных конструкций индуцировать специфический иммунный ответ на модели лабораторных животных.

ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ МЕТОДЫ

При иммунизации использовались 5–6-недельные мыши BALB/c (самки) весом 16–18 г. Мышей иммунизировали внутримышечно трехкратно с интервалом две недели дозой 100 мкг ДНК-вакцины. Через две недели после последней иммунизации у животных удаляли селезенки, из которых выделяли спленоциты для анализа иммунного ответа Т-клеток. Для оценки иммунного ответа мышцей после иммунизации ДНК-вакцинами использовали два метода: ELISpot и ICS. Стимуляцию спленоцитов осуществляли с использованием смеси синтетических пептидов, входящих в состав сконструированных антигенов. Анализ IFN γ ELISpot проводили с использованием набора Becton Dickinson (США) в соответствии с инструкцией производителя. ICS выполняли в соответствии со стандартным протоколом BD Biosciences.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты, полученные с помощью IFN γ ELISpot показали, что индукция специфического Т-клеточного ответа происходит в группах мышцей, иммунизированных как смесью ДНК-вакцинных конструкций (pEV.CTL+pEV.Th), так и конструкцией pEV.CTL, кодирующей поли-CTL-эпитопный антиген. Однако,

статистически значимые отличия от обоих отрицательных контролей (неиммунизированные мыши и мыши, иммунизированные векторной плазмидой pcDNA3.1) наблюдались только в группе (pEV.CTL+pEV.Th). При этом результаты, полученные с помощью ICS показали, что в отношении индукции IFN γ -продуцирующих CD8 $^+$ Т-лимфоцитов статистически значимые отличия от контроля были обнаружены в группах животных, иммунизированных как pEV.CTL, так и смесью (pEV.CTL+pEV.Th) вакцинных конструкций, тогда как в отношении индукции IFN γ -продуцирующих CD4 $^+$ Т-хелперов достоверный ответ наблюдался только в группе, иммунизированной смесью вакцинных конструкций (pEV.CTL+pEV.Th). Тот факт, что максимальные ответы IFN γ -продуцирующих CD8 $^+$ Т-лимфоцитов ($p=0,024$) и CD4 $^+$ Т-клеток ($p=0,012$) были зарегистрированы в группе животных, иммунизированных смесью вакцинных конструкций, возможно, обусловлен синергетическим эффектом CD8 $^+$ и CD4 $^+$ Т-лимфоцитов. Известно, что одним из недостатков ДНК-вакцинных векторов является их не высокая иммуногенность. Поэтому, для повышения эффективности исследуемых вакцин следующим этапом нашей работы станет использование специальных средств доставки плазмид, в частности дендримеров, которые представляют собой искусственные полимеры, имеющие сферическую структуру, содержащие плотное ядро и различные функциональные группировки на поверхности. Основные преимущества дендримеров, как средства доставки – их стабильность, высокий молекулярный вес, монодисперсность, низкая вязкость, наличие заряженных концевых групп.

Исследование проводилось в рамках выполнения государственного задания ГЗ-25/16.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. *Бажан С. И., Антонец Д. В., Карпенко Л. И., Орешкова С. Ф., Старостина Е. В., Дудко С. Г., Ильичев А. А.* Дизайн искусственных иммуногенов, содержащих Т-клеточные эпитопы белков вируса Эбола. Биотехнология 2018, Т. 34(6), 69–79. [Bazhan S. I., Antonets D. V., Karpenko L. I., Oreshkova S. F., Starostina E. V., Dudko S. G., Ilyichev A. A. Design of Artificial Immunogens Containing T-Cell Epitopes of Ebola Virus Proteins. // Biotechnologia. 2018.– Vol. 34(6), 69–79.]

IMMUNOGENICITY OF DNA VACCINE CONSTRUCTS ENCODING EBOLA VIRUS CYTOTOXIC AND T-HELPER EPITOPES

© 2019 S. I. Bazhan*, D. V. Antonets, S. G. Dudko,
O. N. Kaplina, L. I. Karpenko, A. A. Ilyichev

*E-mail: bazhan@vector.nsc.ru

State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector» Rospotrebnadzor,
Koltsovo, Novosibirsk region, Russia

Received: 15.03.2019. Accepted: 29.03.2019

The lack of effective vaccines against Ebola virus initiates a search for new approaches to solving this problem. One of the promising directions in development of antiviral vaccines based on designing DNA-vaccines encoding artificial polyepitope immunogens. Previously, using the original software, we designed two polyepitopic T-cell immunogens containing cytotoxic and T-helper epitopes of Ebola virus and showed that DNA vaccines based on them provide synthesis of target mRNA and proteins in a culture of eukaryotic cells. As part of this work, we have shown that engineered DNA vaccine constructs induce virus-specific responses of CD4⁺ and CD8⁺ T-lymphocytes in immunized mice.

Key words: influenza virus, «universal vaccine», DNA vaccine, polyepitopic immunogen

Authors:

Bazhan S. I., ✉ PhD, Dr. Sci., head of Theoretical Department, State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector» Rospotrebnadzor, Koltsovo, Russia. E-mail: bazhan@vector.nsc.ru;

Antonets D. V., PhD, researcher of Theoretical Department, State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector» Rospotrebnadzor, Koltsovo, Russia;

Dudko S. G., researcher of Bioengineering Department, State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector» Rospotrebnadzor, Koltsovo, Russia;

Kaplina O. N., researcher of Bioengineering Department, State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector» Rospotrebnadzor, Koltsovo, Russia;

Karpenko L. I., PhD, Dr. Sci., head of Recombinant vaccines Laboratory of Bioengineering Department, State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector» Rospotrebnadzor, Koltsovo, Russia;

Ilyichev A. A., PhD, Dr. Sci., head of Bioengineering Department, State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector» Rospotrebnadzor, Koltsovo, Russia.

РАЗРАБОТКА КАНДИДАТНОЙ СИНТЕТИЧЕСКОЙ ВАКЦИНЫ ДЛЯ ИММУНОТЕРАПИИ МЕЛАНОМЫ

© 2019 г. Е. А. Боробова*, Д. В. Антонец, Е. В. Старостина

*E-mail: borobova-elena@rambler.ru

ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»
Роспотребнадзора, Кольцово, Новосибирская обл., Россия

Поступила: 15.03.2019. Принята: 01.04.2019

Меланома является наиболее опасным злокачественным новообразованием кожи, отличается быстрыми темпами роста и высокой частотой формирования метастазов. Для клеток меланомы характерно присутствие раковых антигенов на поверхности. В связи с этим существует возможность разработки вакцины против меланомы. Ранее в ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» были созданы ДНК-конструкции, кодирующие искусственные полиэпитопные иммуногены MEL-A0201 и MEL-TCI, содержащие Т-клеточные эпитопы из шести антигенов меланом. В данной статье представлены результаты исследования способности созданных ДНК-конструкций индуцировать противоопухолевый иммунный ответ.

Ключевые слова: меланома, ДНК-конструкции, Т-клеточные эпитопы, искусственные иммуногены, цитотоксические Т-лимфоциты

DOI: 10.31857/S102872210006491-5

Адрес: 630559, р.п. Кольцово, Новосибирская область, ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», отдел биоинженерии, Боробова Елена Александровна. Тел.: +7913 397 1093 (моб.).

E-mail: borobova-elena@rambler.ru

Авторы:

Боробова Е. А., научный сотрудник отдела биоинженерии ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», Роспотребнадзора, Кольцово, Новосибирская обл., Россия;

Антонец Д. В., канд. биол. наук, старший научный сотрудник теоретического отдела, ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Кольцово, Новосибирская обл., Россия;

Старостина Е. В., научный сотрудник отдела биоинженерии ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», Роспотребнадзора, Кольцово, Новосибирская обл., Россия.

Меланома является наиболее опасным злокачественным новообразованием кожи. На долю меланомы приходится всего 1% от всех злокачественных новообразований, но до 80% летальных исходов [1]. Низкая эффективность лечения связана с ранним метастазированием и формированием резистентности к классическим методам терапии. Высокая иммуногенность меланомных опухолей, обусловленная специфическими антигенами (Melan-A/MART-1, gp100, тирозиназа, MAGE-3 и NY-ESO-1 и др.), дает надежду на создание эффективной терапевтической вакцины [2]. Многообещающим

подходом к лечению больных с онкологическими заболеваниями является ДНК-вакцинация, направленная на активацию цитотоксических CD8⁺ Т-лимфоцитов, главных эффекторных клеток противоопухолевого иммунитета [3]. Ранее нами был проведен теоретический дизайн последовательностей двух искусственных иммуногенов, содержащих цитотоксические (CD8⁺ CTL) и хелперные (CD4⁺ Th) Т-клеточные эпитопы шести меланомных антигенов (NY-ESO-1, MART-1, MAGE-A1, MAGE-A11, MAGE-A3 и MAGE-C1). Иммуноген MEL-TCI содержит эпитопы, рестриктированные наиболее распространенными аллельными вариантами молекул HLA I класса. MEL-A0201 содержит эпитопы, рестриктированные молекулами HLA-A*02:01. Спроектированные гены были синтезированы и клонированы в составе плазмиды pсDNA3.1. В качестве положительного контроля использовалась плазида, кодирующая полноразмерный антиген клеток меланомы MART-1. Экспрессия целевых генов в составе плазмидных ДНК была подтверждена с помощью ОТ-ПЦР, иммуноблоттинга и внутриклеточного окрашивания продукта экспрессии специфическими МКА 29F2 к белку-маркеру p24 [4].

Цель исследования: оценить способность ДНК-конструкций pMEL-TCl и pMEL-A0201, кодирующих искусственные полиэпитопные антигены меланомы, индуцировать противоопухолевый ответ в системе индукции Т-клеточного ответа *ex vivo*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Способность полученных плазмидных ДНК индуцировать противоопухолевый иммунный ответ изучалась *ex vivo* с использованием мононуклеарных клеток (МНК) периферической крови человека. МНК HLA-A*02:01⁺ доноров выделяли из лейкомаксы на градиенте плотности фикола. Прилипшую фракцию клеток культивировали в присутствии коктейля цитокинов до стадии зрелых дендритных клеток (ДК) [5]. На стадии незрелых ДК проводилась процедура магнитной трансфекции. Зрелые ДК, трансфицированные плазидами pMEL-TCl, pMEL-A0201, pcDNA-MART1, pcDNA3.1, подвергались совместному культивированию с неприлипшей фракцией МНК (в соотношении ДК: МНК = 1:10). Уровень продукции гранзима В аутологичными CD8⁺ Т-лимфоцитами в совместной культуре МНК+ДК изучался с помощью метода проточной цитофлюориметрии. Анализ цитотоксической активности эффекторных клеток проводился с помощью измерения активности лактатдегидрогеназы (ЛДГ), высвобождаемой из поврежденных клеток-мишеней, в качестве которых использовались клетки меланомы линии Mel Is.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Показано, что дендритные клетки HLA-A*02:01⁺ доноров, трансфицированные ДНК-конструкциями pMel-A0201 и pMel-TCl, способны стимулировать цитотоксическую активность аутологичных МНК по отношению к клеткам меланомы Mel Is. При этом, как по эффективности индукции цитотоксического ответа, так и по стимуляции продукции гранзи-

ма В, pMel-A0201 достоверно превзошла ДНК-конструкцию, кодирующую белок MART-1.

ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные результаты свидетельствуют о том, что искусственные полиэпитопные антигены способны индуцировать иммунный ответ в отношении клеток меланомы человека. Обнаружение в совместных культурах МНК и трансфицированных ДК популяции CD8⁺ Т-лимфоцитов, продуцирующих гранзим, позволяет предположить, что цитотоксическая активность эффекторных лимфоцитов, опосредована активностью гранзима В. Данный подход может использоваться не только для разработки иммунотерапевтических вакцин от меланомы, но и от других онкологических заболеваний.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Siegel R, Miller K, Jemal A. Cancer Statistics, 2018. *Ca-a Cancer Journal for Clinicians*. 2018, 68(1), 7–30. doi: 10.3322/caac.21442.
2. Pitcovski J., Shahar E., Aizenshtein E, Gorodetsky R. Melanoma antigens and related immunological markers. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 2017, Vol. 115, P. 36–49.
3. Liu M. DNA vaccines: an historical perspective and view to the future. *Immunological reviews*. 2011. Vol. 239. P. 62–84
4. Боробова Е. А., Антонец Д. В., Старостина Е. В., Смирнова О. Ю., Щербаков Д. Н., Волкова О. Ю., Орешкова С. Ф., Карпенко Л. И., Ильичев А. А., Бажан С. И. Кандидаты ДНК-вакцины против меланомы: дизайн, конструирование и оценка экспрессии целевых генов в эукариотических клетках. Новосибирский государственный университет. 2012, 10(5), 23–30. [Borobova E. A., Antonets D. V., Starostina E. V., Smirnova O. Yu., Shcherbakov D. N., Volkova O. Yu., Oreshkova S. F., Karpenko L. I., Ilyichev A. A., Bazhan S. I. Candidates of dna vaccine against melanoma: design, engineering and estimating the expression of target genes in eukaryotic cells. NSU. 2012, 10(5), 23–30].
5. Park M., Yang D., Kim M., Jang J., Jang Y., Lee Y., Jin C., Pham T., Thi T., Lim M., Lee H., Hong C., Yoon J., Lee J. Alpha-type 1 polarized dendritic cells loaded with apoptotic allogeneic breast cancer cells can induce potent cytotoxic t lymphocytes against breast cancer. *Cancer Res Treat*. 2011, 43(1), 56–66.

DEVELOPMENT OF A CANDIDATE SYNTHETIC VACCINE FOR IMMUNOTHERAPY OF MELANOMA

© 2019 E. A. Borobova*, D. V. Antonets, E. V. Starostina

*E-mail: borobova-elena@rambler.ru

Federal Budgetary Research Institution State Research Center of Virology
and Biotechnology «Vector», Koltsovo, Novosibirsk region, Russia

Received: 15.03.2019. Accepted: 01.04.2019

Melanoma is the most dangerous skin cancer. It's characterized by rapid growth rates and high incidences of metastasis. Melanoma cells have tumor antigens on their surfaces. Thereby, it's possible to create an effective vaccine against melanoma. Earlier in the Federal Budgetary Research Institution State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector» DNA-constructs, encoding artificial poly-epitope immunogens MEL-A0201 and MEL-TCI, that consist of cytotoxic and helper T-cell epitope form six melanoma antigens, were created. This article includes the results of evaluation of the capability of designed DNA-constructs to induce antitumor immune response.

Key words: melanoma, DNA-constructs, T-cell epitope, artificial immunogens, cytotoxic T-lymphocytes

Authors:

Borobova E. A., ✉ researcher in Federal Budgetary Research Institution State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Koltsovo, Novosibirsk region, Russia. **E-mail:** borobova-elena@rambler.ru;

Antonets D. V., PhD, senior researcher in Federal Budgetary Research Institution State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Koltsovo, Novosibirsk region, Russia;

Starostina E. V., researcher in Federal Budgetary Research Institution State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Koltsovo, Novosibirsk region, Russia.

ОБНОВЛЕНИЕ ШТАММОВОГО СОСТАВА СЕЗОННЫХ ВАКЦИН ДЛЯ ЕЖЕГОДНОЙ ПРОФИЛАКТИКИ ГРИППА В ПОСЛЕДНИЕ ГОДЫ

© 2019 г. Ю. М. Васильев

E-mail: y.m.vasiliev@hpb.spb.ru

ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

Поступила: 15.03.2019. **Принята:** 28.03.2019

Для обеспечения эффективности ежегодной профилактики гриппа с помощью вакцин эксперты Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) издают рекомендации по штаммовому составу. В последние годы произошел ряд событий, вплоть до отсрочки рекомендации на 1 месяц, которые ставят под угрозу своевременное обеспечение населения эффективными и безопасными вакцинами против гриппа с актуальным штаммовым составом в достаточных количествах.

Ключевые слова: вакцины, грипп, штаммы, рекомендации

DOI: 10.31857/S102872210006490-4

Адрес: 197110 Санкт-Петербург, ул. Пудожская, д. 7, ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Васильев Юрий Михайлович. Тел.: +7(812) 499-17-00.

E-mail: y.m.vasiliev@hpb.spb.ru

Авторы:

Васильев Ю. М., к.б.н., исполняющий обязанности директора ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия.

Грипп остается одной из наиболее актуальных проблем современного здравоохранения. По данным экспертов Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) ежегодно гриппом переболевают до 10% взрослого населения и до 30% детей, до миллиона человека погибают от инфекции или ее осложнений [1]. Кроме того, эпидемии наносят значительный экономический ущерб, а новые вирусы с пандемическим или эпизоотическим потенциалом могут появиться в любом месте в любое время.

Для специфической иммунопрофилактики ежегодных эпидемий используют сезонные гриппозные вакцины. В связи с высокой изменчивостью вируса регулярно, практически каждый эпидемический сезон, появляются новые варианты гриппа, и, как следствие, для обеспечения эффективности вакцин необходимо обновлять

штаммовый состав. В итоге, своевременная профилактика с использованием вакцин – основной способ борьбы с гриппом, а также подготовки к возможной пандемии.

Под эгидой ВОЗ выстроена система, консолидирующая эпидемиологические и вирусологические данные по гриппу по всему миру, а также по эффективности вакцин в течение текущего эпидемического сезона. На основе этих данных эксперты ВОЗ принимают решение по рекомендации определенных штаммов для включения в состав сезонных вакцин [2]. Фактически рекомендации издаются 2 раза в год – в феврале для следующего эпидемического сезона Северного полушария (СП) и в сентябре – для сезона Южного Полушария (ЮП). Следует, однако, отметить, что позиция ВОЗ носит рекомендательный характер – национальные органы здравоохранения вправе корректировать уже непосредственно требования к сезонным гриппозным вакцинам.

После объявления штаммового состава работа не останавливается, а, наоборот, только расширяется: разрабатываются высокопродуктивные штаммы-реассортанты, готовятся стандартные реактивы (антигены, сыворотки), а производители вакцин занимаются прикладными исследованиями и разработками в части оптимизации

технологии под новые штаммы и повышения урожайности.

Анализ рекомендаций ВОЗ за время существования системы рекомендаций показал, что, в целом, штамм меняется 1 раз в год для эпидемического сезона СП и ЮП. Следует отметить, однако, что в последние годы произошел целый ряд кардинальных изменений в рекомендации.

Во-первых, с сезона 2013 г. (ЮП) и 2013–2014 гг. (СП) в рекомендации дополнительно введен штамм вируса гриппа типа В другой линии (для 4-валентных вакцин). Как следствие, сезонные вакцины для ежегодной профилактики гриппа содержат 2 вируса гриппа типа А (серотипы H1N1 и H3N2) и 2 вируса гриппа типа В (линий Виктория и Ямагата). Более того, с сезона 2018–2019 гг. (СП) и 2019 г. (ЮП) рекомендации для 4-валентных вакцин – основные. С прикладной точки зрения организации производства и лицензирования вакцин – необходимо иметь 2 самостоятельных иммунобиопрепарата. Более того, при тех же мощностях производства можно изготовить на 25–33% меньше доз 4-валентной в сравнении с 3-валентной вакциной.

Во-вторых, с сезона 2019 г. (ЮП) впервые введена рекомендация для неэмбриональных (например, культуральных) вакцин в отношении штамма вируса гриппа серотипа H3N2: штамм A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016 (H3N2). С учетом перспектив масштабирования и стандартизации новых неэмбриональных вакцин против гриппа рекомендация целесообразна, однако в предшествующем сезоне этот же штамм рекомендовался ВОЗ для всех вакцин, в том числе классических эмбриональных.

В-третьих, на сезон 2019 г. (ЮП) Австралия откорректировала рекомендации ВОЗ: для 3-валентных вакцин был рекомендован штамм B/Phuket/3073/2013 (линия Ямагата), в отличие от позиции ВОЗ (штамм B/Colorado/06/2017, линия Виктория). Для 4-валентных изменений не было.

Необходимо отметить, что в ходе подготовки к сезону 2019 г. (ЮП) впервые рекомендованный ВОЗ штамм (A/Switzerland/8060/2017 (H3N2)) подпадал под протокол Нагоя. Этот протокол (ратифицированный рядом стран по всему миру) требует конкретных договоренностей при использовании биообъектов, выделенных на территории данной страны. Несмотря на

предложенную Швейцарией упрощенную схему (регистрация штамма), большинство производителей стали использовать появившийся через 1 месяц «подобный» штамм (A/Brisbane/1/2018 (H3N2)). Одним из отрицательных последствий введения данного документа, с позиции общественного здравоохранения, является то, что выбор может делаться не на основе актуальной антигенности, а на основе каких-то иных мотивов.

В завершении следует отметить беспрецедентную ситуацию, когда в отношении сезона 2019–2020 гг. (СП) впервые за много лет как минимум на 1 месяц (до 21 марта 2019 г.) была отсрочена рекомендация по штаммам серотипа H3N2, при этом рекомендация по штамму серотипа H1N1 была также изменена. Как следствие, отгрузка первых доз для начала вакцинальной кампании также задержится как минимум на 1 месяц. С учетом технологических проблем рекомендованных штаммов H3N2 последних лет (низкая гемагглютинирующая активность, низкая урожайность на куриных эмбрионах) – не исключается и более длительная задержка. Кроме того, неожиданной оказалась и смена штамма серотипа H1N1, поскольку в материалах ВОЗ отмечалась антигенная идентичность циркулирующих и вакцинных штаммов текущего сезона. В качестве обоснования смены эксперты называли данные по иммуногенности с сыворотками вакцинированных взрослых добровольцев, в особенности детей.

Таким образом, обновление штаммового состава является одним из ключевых, но не единственным этапом работы всемирной системы своевременного обеспечения населения актуальными вакцинами против гриппа. Только объединенными усилиями всех участников процесса – национальных органов здравоохранения, ВОЗ, лабораторий, а также, что особенно важно, производителей вакцин, можно добиться качественной реализации вакцинопрофилактики гриппа в полном объеме.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. WHO. Vaccines against influenza. WER. 2012, 47, 461–476.
2. WHO. Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2019 southern hemisphere influenza season. WER. 2018, 42, 553–562.

SEASONAL INFLUENZA VACCINE STRAIN RECOMMENDATIONS IN RECENT YEARS

© 2019 Y. M. Vasiliev

E-mail: y.m.vasiliev@hpb.spb.ru

*Research Institute of Ultrapure Biologicals of the Federal Medical-Biological Agency,
St. Petersburg, Russia*

Received: 15.03.2019. **Accepted:** 28.03.2019

World Health Organization (WHO) experts issue strain recommendations to ensure effective yearly influenza vaccination. Several important “firsts” had taken place in recent years. An up to a 1-month recommendation delay puts the whole system of timely procurement of enough doses of effective and safe influenza vaccines based on up-to-date strains at risk.

Key words: vaccines, influenza, strains, recommendation

Author:

Vasiliev Y. M., PhD, Acting Director, Research Institute of Ultrapure Biologicals of the Federal Medical-Biological Agency, St. Petersburg, Russia.

ПЕРСПЕКТИВЫ ПЛАТФОРМ ИММУНОАДЬЮВАНТОВ С УПРАВЛЯЕМЫМИ СВОЙСТВАМИ НА МОДЕЛИ ВАКЦИН ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ ГРИППА

© 2019 г. Ю. М. Васильев

E-mail: y.m.vasiliev@hpb.spb.ru

ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

Поступила: 15.03.2019. Принята: 02.04.2019

Использование адьювантов является одним из наиболее актуальных направлений совершенствования вакцин для профилактики инфекционных заболеваний. На модели различных вакцин против гриппа в опытах на животных показано, что платформы иммуноадьювантов с управляемыми свойствами весьма перспективны (суспензии, эмульсии «масло в воде», препараты на основе хитозана), поскольку учитывают особенности типа вакцины и способа введения.

Ключевые слова: вакцины, адьюванты, грипп, суспензии, эмульсии, хитозан

DOI: 10.31857/S102872210006489-2

Адрес: 197110 Санкт-Петербург, ул. Пудожская, д. 7, ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Васильев Юрий Михайлович. Тел.: +7(812) 499-17-00.

E-mail: y.m.vasiliev@hpb.spb.ru

Авторы:

Васильев Ю. М., к.б.н., исполняющий обязанности директора ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия.

Актуальность создания новых вакцин против актуальных инфекционных заболеваний человека не вызывает сомнения. Необходимы иммунобиопрепараты, оптимально сочетающие эффективность, безопасность, а также экономическую целесообразность при массовом применении.

Одно из наиболее перспективных направлений – включение в состав вакцин иммуноадьювантов, что позволяет, с одной стороны, разрабатывать новые вакцины (в качестве компонента вакцин следующего поколения), а также давать «вторую жизнь» классическим вакцинам.

Весьма интересной в качестве модели для исследования и разработки адьювантов являются вакцины против гриппа. Во-первых, это актуальность инфекционного агента с эпидемической, пандемической и эпизоотической позиции [1]. Во-вторых, это наличие целого ряда принципи-

ально различных типов вакцин, например инактивированные цельновирионные, расщепленные и субъединичные, вводимые внутримышечно (подкожно); живые аттенуированные (в первую очередь холодоадаптированные), вводимые интраназально; а также сезонные 3- и 4-валентные, препандемические, пандемические и ветеринарные вакцины. Как следствие, предоставляется уникальная возможность подтвердить адьювантную активность препарата на принципиально разных типах и вариантах вакцины.

Необходимо отметить, что до сих пор наиболее широко применяемая группа адьювантов – препараты на основе алюминия, куда можно отнести, по крайней мере, минеральные соли, основания или их смеси, в первую очередь – гидроксид алюминия. В то же время за годы применения накопился ряд проблем: вопросы безопасности (нейро- и нефротоксичность, особенно с учетом насыщенности современных календарей прививок), номенклатуры и классификации, а также стандартизации (разные серии того же препарата могут обладать значительно отличающейся активностью).

В последние годы темпы исследований и разработки адьювантов для вакцин только наращивались, имеется ряд интересных направлений как монопрепаратов, так и сложных композиций.

Как правило, публикуются данные успешных доклинических исследований вакцины с добавлением адьюванта и без него, однако очень редко работы доходят до клинических исследований. Даже имеющиеся данные ограничены в части прямого сравнения различных адьювантов, особенно между основными группами (минеральные соли и основания, водомасляные эмульсии и иммуномодуляторы), обоснования каждого из компонентов комплексного препарата, а также на моделях различных типов вакцин и способа введения. Другими словами, один и тот же адьювант вряд ли будет работать с любой вакциной.

Помимо гидроксида алюминия следует отметить адьюванты Фрейнда — как одни из наиболее мощных, не только известных, но и применяемых в практике, в частности для получения кроличьей гипериммунной сыворотки. Характерной чертой является то, что имеется полный и неполный адьюванты Фрейнда, причем отличие заключается в иммуномодулирующем компоненте бактериальной природы, действие которого потенцируется.

С учетом сказанного выше нами были проведены масштабные исследования иммуногенности по сравнению адьювантов внутри основных групп по природе и механизму действия на модели вакцин против гриппа при иммунизации мышей. Затем перспективные кандидаты сравнивали между собой на модели различных по типу и способу введения вакцин против гриппа, причем оценивали не только иммуногенность, но и защитный эффект.

Совокупность полученных данных позволила выделить 3 основных направления. Во-первых, это комплексные адьюванты на основе суспензий и эмульсий типа «масло в воде». За счет возможности менять состав (базовые компоненты + дополнения) препарат получает свойства платформы с управляемыми свойствами для конкретной вакцины. Например, для эмульсий могут добавляться детергенты, при этом за счет

потенцирующего действия общая концентрация детергентов при использовании большего количества компонентов снижается, что обеспечивает снижение реактогенности и, как следствие, повышение безопасности, а также, в силу оптимального распределения антигена в гетерогенной системе, и иммуногенности.

В целом, более иммуногенные вакцины как инактивированные цельновирионные требуют более простых адьювантов; субъединичные, наоборот, — более сложных.

Отдельное внимание заслуживают адьюванты на основе биополимера хитозана. Поскольку под термином хитозан понимается широчайшая совокупность молекул с различными физико-химическими характеристиками (молекулярная масса, степень деацетилирования), модификациями (производные), а также в различных формах (растворы, гели, микрочастицы), свойства адьюванта-платформы появляются за счет управления этими показателями. В целом, для менее иммуногенных вакцин, а также для интраназального введения оптимальными оказались адьюванты на основе хитозана с высокой молекулярной массой и степенью деацетилирования.

Следует подчеркнуть, что был разработан «универсальный» адьювант на основе хитозана, который был весьма иммуногенным практически со всеми изученными вакцинами, хотя и уступал в абсолютных значениях оптимизированным адьювантам из разных платформ под конкретные вакцины.

Таким образом, создание платформ иммуноадьювантов с управляемыми свойствами на основе суспензий, эмульсий «масло в воде», а также хитозана — перспективное направление совершенствования профилактики гриппа с помощью вакцин.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. WHO. Vaccines against influenza. WER. 2012, 47, 461–476.

**PERSPECTIVES OF IMMUNE ADJUVANT PLATFORMS
WITH ADJUSTABLE PROPERTIES FOR INFLUENZA VACCINES**

© 2019 Y. M. Vasiliev

E-mail: y.m.vasiliev@hpb.spb.ru

*Research Institute of Ultrapure Biologicals of the Federal Medical-Biological Agency,
St. Petersburg, Russia*

Received: 15.03.2019. **Accepted:** 02.04.2019

Use of adjuvants is among the most promising approaches for enhancement of vaccines for the control of infectious diseases. Animal experiments with various influenza vaccines have shown that platforms of adjuvants with adjustable properties are very promising (suspensions, oil-in-water emulsions, chitosan-based formulations) because vaccine type and administration route are taken into account.

Key words: vaccines, adjuvants, influenza, suspension, emulsion, chitosan

Author:

Vasiliev Y. M., PhD, Acting Director, Research Institute of Ultrapure Biologicals of the Federal Medical-Biological Agency, St. Petersburg, Russia.

РЕКОМБИНАНТНЫЙ ПНЕВМОЛИЗИН ВЫЗЫВАЕТ ОБРАЗОВАНИЕ АНТИТЕЛ И ЗАЩИЩАЕТ МЫШЕЙ ОТ ПНЕВМОКОККОВОЙ ИНФЕКЦИИ

© 2019 г. Д. С. Воробьев*, Е. С. Петухова, А. В. Сидоров, И. Б. Семенова, Ю. В. Волох, А. Ю. Леонова, Н. А. Михайлова

*E-mail: vorobievdenis@yandex.ru

ФГБНУ Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова, Москва, Россия

Поступила: 15.03.2019. Принята: 29.03.2019

Получен атоксичный рекомбинантный пневмолизин (гPLY) *Streptococcus pneumoniae*. Изучена иммуногенная и протективная активность гPLY. Показано, что в сыворотках мышей после двукратного введения гPLY увеличивается титр IgG до 32 раз по сравнению с сыворотками интактных мышей. После третьего введения гPLY происходит увеличение титра сывороточных IgG до 15 раз по сравнению с исходным уровнем антител после второй иммунизации. Выявлена протективная активность гPLY в опыте активной защиты при внутрибрюшинном заражении мышей *S. pneumoniae*.

Ключевые слова: *Streptococcus pneumoniae*, пневмолизин, титр антител, протективная активность

DOI: 10.31857/S102872210006488-1

Адрес: 105064, г. Москва, М. Казенный пер., 5а, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова», лаборатория терапевтических вакцин, Воробьев Денис Сергеевич.

Тел.: +7 (495) 917 57 74, 8 961 247 99 30 (моб.)

E-mail: vorobievdenis@yandex.ru

Авторы:

Воробьев Д. С., к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории терапевтических вакцин ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова», Москва, Россия;

Петухова Е. С., аспирант, младший научный сотрудник лаборатории терапевтических вакцин ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова», Москва, Россия;

Сидоров А. В., к.б.н., заведующий лабораторией генетики ДНК-содержащих вирусов ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова», Москва, Россия;

Семенова И. Б., д.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории терапевтических вакцин ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова», Москва, Россия;

Волох Ю. В., младший научный сотрудник лаборатории терапевтических вакцин ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова», Москва, Россия;

Леонова А. Ю., младший научный сотрудник лаборатории микробиологии условно патогенных бактерий ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова», Москва, Россия;

Михайлова Н. А., д.м.н., зав. лабораторией протективных антигенов ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова», Москва, Россия.

АКТУАЛЬНОСТЬ

Streptococcus pneumoniae вызывает инвазивные и неинвазивные заболевания наиболее часто у детей младшего возраста и пожилых людей. С одной стороны, заболевания, вызванные *S. pneumoniae*, можно контролировать с помощью вакцинации, с другой – применение профилактических препаратов привело к значительному повышению нозологических форм, вызванных невакцированными серотипами пневмококка. В настоящее время активно разрабатываются вакцины на основе белков пневмококка. Одним из главных факторов вирулентности *S. pneumoniae* белковой природы является пороформирующий токсин пневмолизин [1], ответственный за распространение патогена и разрушение клеток-мишеней. Пневмолизин рассматривается как наиболее консервативный белок, несмотря на большое количество серотипов пневмококка.

Целью работы явилось исследование иммуногенной и протективной активности рекомбинантного пневмолизина.

ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ МЕТОДЫ

Микроорганизмы. В работе использовали штамм *S. pneumoniae* серотипа 3, полученный из ЦКП Коллекция ФГБНУ НИИВС им. И. И. Мечникова. Культуру возбудителя выращивали на кровяном агаре в течение 16–18 ч. в CO₂-инкубаторе при температуре 37 °С и 5% содержании углекислого газа.

Животные. Опыты проводили на мышах линии BALB/c массой 16–18 г.

Пневмококковый атоксичный рекомбинантный пневмолизин (rPLY) получали в клетках *Escherichia coli* и хроматографически очищали с помощью Ni-сефарозы.

Для определения иммуногенности rPLY вводили двукратно и трехкратно в дозе 25 мкг/мышь с интервалом две недели внутрибрюшинно. Через 14 дней после второй и третьей иммунизаций у 10 мышей из каждой группы брали сыворотку крови из хвостовой вены и определяли титр IgG с помощью твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА).

Протективная активность. Рекомбинантный пневмолизин вводили мышам двукратно и трехкратно в дозе 25 мкг/мышь. Белок растворяли в фосфатно-солевом буфере (ФСБ) с добавлением гидроксида алюминия (Sigma, США, из расчета 3 мкг Al(OH)₃ на 1 мкг белка). Сорбцию проводили в течение 12 ч. при температуре 4 °С. Через 3 недели после второй и третьей иммунизаций животных заражали внутрибрюшинно живой вирулентной культурой *S. pneumoniae* серотипа 3. Контрольную группу мышей так же заражали живой вирулентной культурой *S. pneumoniae* серотипа 3, и определяли величину LD₅₀ по формуле Кербера в модификации Ашмарина [2]. Наблюдение за животными проводили в течение 21 дня.

Статистическую обработку полученных результатов проводили методом Манна-Уитни для независимых выборок с помощью программы «Statistica 10.0». Выживаемость мышей в течение заданного срока также рассчитывали по методу Гланца [3]. Статистически достоверным считали различия при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При изучении титров IgG к rPLY в сыворотках мышей было выявлено следующее. В группе животных, иммунизированных белком в дозе

25 мкг/мышь, через 2 недели после второй иммунизации обнаружили увеличение титра антител по сравнению с контрольными мышами, получавших ФСБ, от 4 до 32 раз ($p < 0,01$). Через 2 недели после третьей иммунизации анализ мышинных сывороточных титров IgG к rPLY показал увеличение титра антител от 7,5 до 15 раз по сравнению с предыдущим уровнем IgG в опыте ($p < 0,01$).

При трехкратном введении rPLY наблюдали защиту животных в опыте по сравнению с контролем. Через 72 часа после заражения *S. pneumoniae* серотипа 3 отмечалось 80% выживших мышей против 20% ($p < 0,01$) при заражающей дозе 2,5 LD₅₀ и 60% выживших мышей против 10% ($p < 0,05$) при заражающей дозе 25 LD₅₀. Однако через 96 часов после заражения опытные животные погибали и различия с контролем не выявлялось.

При двукратном введении rPLY наблюдали защиту животных по сравнению с контролем при заражающей дозе 250 LD₅₀. В опыте выжило 50% мышей против 10% в контроле ($p < 0,05$) через 120 часов после заражения. Защита сохранялась в течение всего времени наблюдения (21 день).

Интересно, что при сравнении результатов активной защиты и задержки гибели животных в опыте с титрами сывороточных антител прямой корреляции не выявлено. Защита была обнаружена только при двукратной иммунизации rPLY от заражения 250 LD₅₀ *S. pneumoniae* серотипа 3, в то время, как наибольший титр антител наблюдали после третьего введения препарата. Полученные результаты *in vitro* и *in vivo* позволяют сделать предварительный вывод о перспективности применения rPLY в качестве вакцинного препарата.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Subramanian K., Neill D. R., Malak H. A., Spelmink L., Khandaker S., Dalla Libera Marchiori G., Dearing E., Kirby A., Yang H., Achour A., Nilvebrant J., Nygren P. A., Plant L., Kadioglu A., Henriques-Normark B. Pneumolysin binds to the mannose receptor C type 1 (MRC-1) leading to anti-inflammatory responses and enhanced pneumococcal survival. *Nat. Microbiol.* 2019, 4(1): 62–70.
2. Ашмарин И. П., Воробьев А. А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. Ленинград, 1962: 180 С.
3. Гланц С. А. Медико-биологическая статистика. Изд-во «Практика». Москва, 1999: 459 С.

RECOMBINANT PNEUMOLYSIN INDUCES THE FORMATION OF ANTIBODIES AND PROTECTS MICE FROM PNEUMOCOCCAL INFECTION

© 2019 D. S. Vorobyev*, E. S. Petukhova, A. V. Sidorov, I. B. Semenova, Yu. V. Volokh, A. Yu. Leonova, N. A. Mikhailova

*E-mail: vorobievdenis@yandex.ru

Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia

Received: 15.03.2019. Accepted: 29.03.2019

The obtained recombinant pneumolysin (rPLY) *Streptococcus pneumoniae* in atoxic form. The immunogenic and protective activity of rPLY was studied. It was shown that in the sera of mice after double injection of rPLY, the IgG titer increased by up to 32 times as compared with the sera of intact mice. After the third administration of rPLY, the IgG titer increased by up to 15 times compared with the initial IgG level after the second immunization. The protective activity of rPLY revealed in the experience of active protection in intraperitoneal infection of *S. pneumoniae* mice.

Key words: *Streptococcus pneumoniae*, pneumolysin, antibody titer, protective activity

Authors:

Vorobyev D. S., ✉ PhD, Senior researcher of Laboratory of therapeutic vaccines, Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia. E-mail: vorobievdenis@yandex.ru;

Petukhova E. S., Aspirant of Laboratory of therapeutic vaccines, Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia;

Sidorov A. V., PhD, Head of the Laboratory of genetics of DNA-containing viruses, Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia;

Semenova I. B., D. Sc., Leading researcher of Laboratory of therapeutic vaccines, Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia;

Volokh Yu. V., Junior researcher of Laboratory of therapeutic vaccines, Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia;

Leonova A. Yu., Junior researcher of Laboratory of microbiology of conditionally pathogenic bacteria, Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia;

Mikhailova N. A., D. Sc., Head of the Laboratory of protective antigens, Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia.

РАЗРАБОТКА И ДОКЛИНИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ РЕКОМБИНАНТНОЙ ВАКЦИНЫ СИНЕГНОЙНОЙ

© 2019 г. Н. А. Михайлова¹, А. А. Калошин¹, Е. М. Зими́на¹,
Е. О. Калиниченко¹, А. В. Солдатенкова¹, Н. Г. Плеханова²,
Д. В. Виктор²

*E-mail: alex-k-1973@yandex.ru

¹ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова, Москва, Россия;

²ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, Волгоград, Россия

Поступила: 14.03.2019. Принята: 26.03.2019

Получены три экспериментальные серии рекомбинантной вакцины синегнойной (PBC), состоящей из комплекса рекомбинантного белка F наружной мембраны (OrgF) и рекомбинантного анатоксина, сорбированных на гидроокиси алюминия. В проведенных доклинических исследованиях подтверждена иммуногенность препарата при отсутствии пирогенности, острой и хронической токсичности, аллергенности и иммунотоксичности.

Ключевые слова: *Pseudomonas aeruginosa*, рекомбинантная вакцина синегнойная (PBC), белок F наружной мембраны (OrgF), анатоксин

DOI: 10.31857/S102872210006487-0

Адрес: 105064, г. Москва, М. Казенный пер., 5а, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова», лаборатория протективных антигенов, Михайлова Наталья Александровна.
Тел./факс: +7(495) 9175630, 8965 136 51 45 (моб.).

E-mail: alex-k-1973@yandex.ru

Авторы:

Михайлова Н. А., д.м.н., профессор, заведующая лабораторией протективных антигенов ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова», Москва, Россия;

Калошин А. А., к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории протективных антигенов ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова», Москва, Россия;

Зими́на Е. М., м.н.с. лаборатории протективных антигенов ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова», Москва, Россия;

Калиниченко Е. О., аспирант ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова», Москва, Россия;

Солдатенкова А. В., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории протективных антигенов ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова», Москва, Россия;

Плеханова Н. Г., к.б.н., заведующая лабораторией экспериментальных биомоделей ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора, Волгоград, Россия;

Виктор Д. В., д.б.н., руководитель временного творческого коллектива ФКУЗ «Волгоградский научно-исследо-

вательский противочумный институт» Роспотребнадзора, Волгоград, Россия.

АКТУАЛЬНОСТЬ

Распространение синегнойной инфекции в медицинских стационарах наносит значимый социально-экономический ущерб. Это связано с наличием у возбудителя (*Pseudomonas aeruginosa*) множества факторов патогенности и механизмов выработки полирезистентности к антибиотикам [1]. Поэтому актуальным направлением по разработке методов борьбы с синегнойной инфекцией является создание вакцины [2]. В НИИВС им. Мечникова проводятся исследования по разработке антисинегнойных вакцин на основе комплексов рекомбинантных белков и их гибридных вариантов. Установлено, что кандидатные антигены стимулировали протективный эффект в экспериментах на животных [3].

Целью работы явилось получение и доклиническое исследование вакцины, представляющей собой комплекс рекомбинантного белка F наружной мембраны (OrgF) и рекомбинантного анатоксина (нетоксического делеционного варианта экзотоксина А), предназначенной для профилактики синегнойной инфекции.

ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ МЕТОДЫ

Рекомбинантные белки синтезировали в клетках *E. coli* и очищали в колонках с никель-сефарозой. В качестве адьюванта использовали гель гидроокиси алюминия. Защитные свойства исследовали на мышах, которых иммунизировали внутрибрюшинно двукратно с двухнедельным интервалом. Через две недели после второй иммунизации животных заражали культурой *P. aeruginosa* штамма PA103.

Исследование пирогенности РВС проводили на кроликах. При изучении острой токсичности препараты вводили мышам и морским свинкам, осуществляя контроль веса, гематологических показателей, патоморфологические и гистологические исследования на 7-е и 15-е сутки. При оценке хронической токсичности вакцину вводили ежедневно в течение 10 суток крысам и морским свинкам, исследуя вышеперечисленные показатели на 11-е сутки. Местное и местно-раздражающее действие РВС оценивали на морских свинках (внутрикожное введение) и кроликах (инстиляция глаз). При изучении аллергенных свойств проводили трехдневное введение препаратов: подкожно для морских свинок и внутрибрюшинно для мышей. Морским свинкам через 21 день вводили внутривенно несорбированные препараты, а мышам через 7 дней вводили РВС в подушечки одной из лап, стимулируя реакцию гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ).

При исследовании влияния на гуморальный иммунитет РВС инъецировали внутрибрюшинно мышам, а через час вводили эритроциты барана (ЭБ). Через 5 дней определяли число антителобразующих клеток в селезенках. Оценка влияния вакцины на клеточный иммунитет осуществляли путём стимуляции ГЗТ к ЭБ и полному адьюванту Фрейнда (ПАФ) на мышах и морских свинках, соответственно. Мышам ЭБ вводили подкожно одновременно с внутрибрюшинным введением вакцины, затем на 5 сутки в одну из лап инъецировали ЭБ. Морским свинкам вводили РВС и ПАФ. На 21 сутки животные подкожно получали РВС и физиологический раствор (контроль).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

РВС в одной предполагаемой человеческой дозе содержала 25 мкг рекомбинантного белка OprF, 50 мкг рекомбинантного анатоксина и 225 мкг гидроокиси алюминия. Для трех экспериментальных серий РВС подтверждены сте-

рильность, подлинность и апиrogenность. Перед смешиванием отдельные рекомбинантные антигены были охарактеризованы на чистоту, подлинность, стерильность и иммуногенность. Индексы эффективности защитных свойств для исходных рекомбинантных белков соответствовали 2,0; 2,1 и 2,0 в случае рекомбинантного OprF и 2,0; 2,3; 2,1 в случае рекомбинантного анатоксина. Индексы эффективности защитных свойств трех экспериментальных серий РВС составили: 3,3; 3,0 и 3,3. Эти результаты подтвердили аддитивный эффект, получаемый в результате смешивания двух компонентов.

На двух видах животных установлено отсутствие острой и хронической токсичности экспериментальных серий РВС, а также местное действие на коже морских свинок и местно-раздражающего эффекта слизистых глаз кроликов. При исследовании РВС выявлены незначительные симптомы аллергической реакции при введении морским свинкам препаратов, в дозе, десятикратно превышающей предполагаемую дозу для человека, которые исчезали в течение часа. В опытах на мышах не выявлено аллергических реакций ГЗТ. РВС не оказывала существенного иммунотоксического действия.

Таким образом, в результате проведенных исследований получены три серии рекомбинантной вакцины синегнойной, обладающие иммуногенностью и безопасностью.

Работа выполнена в соответствии с Государственным Контрактом от 28 апреля 2017 г. № 14. N08.11.0135 в рамках ФЦП «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Лазарева А. В., Чеботарь И. В., Крыжановская О. А., Чеботарь В. И., Маянский Н. А. *Pseudomonas aeruginosa* патогенность, патогенез и патология. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2015, 17(3):170–186. [Lazareva A. V., Tchebotar I. V., Kryzhanovskaya O. A., Tchebotar V. I., Mayanskiy N. A. *Pseudomonas aeruginosa*: Pathogenicity, Pathogenesis and Diseases / Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya. 2015, 17(3):170–186.]
2. Doring G. and Pier G. B. Vaccines and immunotherapy against *Pseudomonas aeruginosa*. Vaccine, 2008, 6(8):1011–1024.
3. Калошин А. А., Солдатенкова А. В., Леонова Е. И., Михайлова Н. А. Получение рекомбинантного гибридного белка OprF-aTox *Pseudomonas aeruginosa* и исследование его протективных свойств.

Российский иммунологический журнал. 2015, 9(2): 490–491. [Kaloshin A. A., Soldatenkova A. V., Leonova E. I., Mihailova N. A. Obtaining the recombinant

fusion protein OprF-aTox *Pseudomonas aeruginosa* and assessment of its protective properties. Russian Journal of Immunology 2015, 9(2): 490–491.]

OBTAINING AND PRECLINICAL STUDIES OF RECOMBINANT PSEUDOMONAS VACCINE

© 2019 N. A. Mikhailova¹, A. A. Kaloshin¹, E. M. Zimina¹, E. O. Kalinichenko¹, A. V. Soldatenkova¹, N. G. Plekhanova², L. V. Victorov²

*E-mail: alex-k-1973@yandex.ru

¹The Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia;

²The Volgograd Antiplague Research Institute of Rospotrebnadzor, Volgograd, Russia

Received: 14.03.2019. Accepted: 26.03.2019

Three experimental lots of Recombinant Pseudomonas Vaccine (RPV) consisting a complex of the recombinant outer membrane protein F (OprF) and the recombinant toxoid that were sorbed on aluminum hydroxide have been obtained. During preclinical studies, we confirmed the immunogenicity of the vaccine that had not pyrogenicity, acute and chronic toxicity, allergenicity and immunotoxicity.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*, Recombinant Pseudomonas Vaccine (RPV), Outer Membrane Protein F (OprF), Toxoid

Authors:

Mikhailova N. A., ✉ D. Sc., Head of the Laboratory of the protective antigens, Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia. **E-mail:** alex-k-1973@yandex.ru;

Kaloshin A. A., PhD, Leading researcher of Laboratory of the protective antigens, Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia;

Zimina E. M., Researcher of Laboratory of the protective antigens, Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia;

Kalinichenko E. O., Aspirant of Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia;

Soldatenkova A. V., PhD, Senior research of Laboratory of the protective antigens, Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia;

Plekhanova N. G., PhD, Head of the Laboratory of the experimental biomodels, Antiplague Research Institute of Rospotrebnadzor, Volgograd, Russia;

Victorov L. V., D. Sc., Head of the temporary creative team, Volgograd Antiplague Research Institute of Rospotrebnadzor, Volgograd, Russia.

АКТУАЛЬНЫЕ ПРОБЛЕМЫ ВАКЦИНОПРОФИЛАКТИКИ ВПЧ-АССОЦИИРОВАННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

© 2019 г. Т. Н. Никитина*, И. Е. Жук, В. И. Климов,
Т. Ю. Козлова, Д. В. Горенков

*E-mail: nikitina@expmed.ru

ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения»
Минздрава РФ, Москва, Россия

Поступила: 27.02.2019. Принята: 12.03.2019

Вирус папилломы человека является самым распространенным среди всех инфекций вирусной этиологии, передаваемых половым путем. Вызывает ВПЧ-ассоциированные заболевания, которые приводят к серьезным последствиям для здоровья человека. Персистенция ВПЧ высокого онкогенного риска на протяжении длительного времени может вызывать развитие рака шейки матки. Эффективным методом профилактики ВПЧ-ассоциированных заболеваний является вакцинация, показавшая безопасность и высокую эффективность.

Ключевые слова: вирус папилломы человека, ВПЧ-ассоциированные заболевания, вакцинопрофилактика, рак шейки матки

DOI: 10.31857/S102872210006486-9

Адрес: 127051, Москва, Петровский б-р, д. 8, стр. 2, ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава РФ, Никитина Татьяна Николаевна. Тел.: +7 (965) 132-38-95 (моб.)

E-mail: 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;

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;

Козлова Т. Ю., эксперт 1 категории 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.

Заболеваемость населения инфекциями, передаваемыми половым путем, является важной медико-социальной проблемой в большинстве стран мира, в том числе и в России. Из всех вирусных инфекций, поражающих урогенитальный тракт, наибольшую значимость представляет вирус папилломы человека (ВПЧ), который

приводит к развитию ВПЧ-ассоциированных заболеваний (орофарингеальный рак, анальный рак, рак вульвы, влагалища, шейки матки и др.) и которым инфицированы около 291 миллиона женщин во всем мире [1].

Цель исследований состояла в анализе ВПЧ-ассоциированной заболеваемости населения, в том числе с учетом применения вакцин против ВПЧ. Для решения поставленных задач были использованы информационно-аналитические методы анализа и обобщены данные ведущих зарубежных и отечественных научно-методических документов.

По распространенности ВПЧ занимает первое место среди всех инфекций вирусной этиологии, передаваемых половым путем. Данные по инфицированию населения ВПЧ показывают, что количество носителей папилломавируса в России составляет 15,9 человек, в европейских странах — 9,6 человек, в США — 6,6 человек на 100 000 женского населения. Около 9,4% женского населения Российской Федерации инфицированы ВПЧ 16–18 типов, из которых 73,8% случаев приходится на инвазивный рак шейки матки (РШМ). Персистенция ВПЧ высокого онкогенного риска на протяжении длительно-

го времени в эпидермальном слое генитального тракта (от 6 месяцев до 5 лет) может привести к развитию РШМ. В 2018 году в развивающихся странах было выявлено 570 000 новых случаев заболеваний РШМ, что составило 84% от всех новых случаев в мире. Каждый год в мире около 311 000 женщин умирает от РШМ [2]. В России за последние 10 лет заболеваемость РШМ выросла в несколько раз: с 7,35 (2006 г.) человек до 25,1 (2016 г.) человек на 100 000 женского населения, ежегодно регистрируется порядка 15–16 тысяч новых случаев РШМ и более 7 000 случаев летальных исходов [3].

Актуальное значение имеют различные методы профилактики ВПЧ-ассоциированных заболеваний, среди которых эффективным является вакцинация. Эффективность вакцинопрофилактики заключается в формировании защитного иммунитета с развитием гуморального и клеточного иммунных ответов против ВПЧ. В настоящее время в мире зарегистрированы 3 вакцины для первичной специфической профилактики заболеваний, связанных с папилломавирусной инфекцией: двухвалентная Церварикс (Бельгия); четырехвалентная Гардасил (Нидерланды); девятивалентная Гардасил 9 (Нидерланды). В Российской Федерации имеют государственную регистрацию только две вакцины – двухвалентная Церварикс (содержащая белок L1 типов ВПЧ 16 и 18) и четырехвалентная Гардасил (содержащая белок L1 типов ВПЧ 6, 11, 16 и 18). Вакцины не являются терапевтическими, но дают перекрестную защиту от других типов ВПЧ, которые в них не включены. Опыт применения вакцин против ВПЧ во всем мире показал их безопасность и высокую профилактическую эффективность. Важные данные по снижению доли интраэпителиальных поражений шейки матки в результате вакцинации среди женщин разного возраста были получены в Австралии. Так, эффективность после применения трех доз вакцин от ВПЧ составила в популяции 15–18-летних – 57%, 19–22-летних – 53%. Уменьшение риска развития ВПЧ-ассоциированного рака в результате вакцинации было отмечено в Дании и Финляндии: развитие интраэпителиальных поражений и рака было сокращено после вакцинации до 60% и 80% (Дания) и отсутствовало в группе

женщин после вакцинации от ВПЧ (Финляндия) по сравнению с группами невакцинированных от ВПЧ женщин, в которых были выявлены случаи ВПЧ-ассоциированных заболеваний (РШМ, орофарингеальный рак, рак вульвы) [4]. В России иммунизация девочек 12–13 лет против РШМ в Московской области (2007–2010 гг., 2011–2016 гг.) показала достоверное снижение частоты заболеваемости аногенитальными кондиломами с 14,2 случаев в 2009 г. до 5,9 случаев в 2016 г. на 100 000 девочек [5].

Проведенные теоретические исследования подтверждают высокую распространенность ВПЧ-ассоциированных заболеваний, как во всем мире, так и в России. Доказанная эффективность вакцинопрофилактики против ВПЧ обуславливает необходимость разработки более четкой стратегии внедрения профилактических мер для снижения частоты ВПЧ-ассоциированных заболеваний разных возрастных групп населения во всех регионах Российской Федерации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCE

1. Report on global sexually transmitted infection surveillance, 2018. Geneva: World Health Organization; 2018. Retrieved from: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/250268/WHO-RHR-16.09-rus.pdf?sequence=1>. Accessed 04 Feb 2019.
2. 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.
3. Bruni L., Albero G., Serrano B., Mena M., Gómez D., Muñoz J., Bosch F.X., de Sanjosé S. ICO/IARC Information Centre on HPV and Cancer (HPV Information Centre). Human Papillomavirus and Related Diseases in the World. Summary Report 22 January 2019. Retrieved from: <http://www.hpvcentre.net/statistics/reports/RUS.pdf>. Accessed 04 Feb 2019.
4. Luostarinen T., Apter D., Dillner J., Eriksson T., Harjula K., Natunen K., Paavonen J., Pukkala E., Lehtinen M. Vaccination protects against invasive HPV-associated cancers. *Int J Cancer*. 2018; 142(10), 2186–2187.
5. Зарочентсева Н. В., Белая Ю. М. Современный взгляд на остроконечные кондиломы: возможности лечения и профилактики. *Российский вестник акушера гинеколога*. 2017; (1), 109–12. [Zarochentseva N. V., Belaya Yu. M. A modern view of genital warts: the possibilities of treatment and prevention. *Russian Bulletin of the obstetrician gynecologist*. 2017; (1), 109–12].

ACTUAL PROBLEMS OF VACCINE PROPHYLAXIS OF HPV-RELATED DISEASES

© 2019 T. N. Nikitina*, I. E. Zhuk, V. I. Klimov, T. Yu. Kozlova,
D. V. Gorenkov

*E-mail: 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: 27.02.2019. **Accepted:** 12.03.2019

Human papillomavirus (HPV) is the most common viral infection of the reproductive tract. It can cause HPV-related diseases that lead to serious health problems. Persistent high-risk (HR) human papillomavirus infection is necessary for development of cervical cancer. Vaccination is an effective method to prevent HPV-related diseases. The world experience in using of HPV vaccines has shown their safety and high effectiveness.

Key words: human papillomavirus, HPV-related diseases, vaccine prophylaxis, cervical cancer

Authors:

Nikitina T. N., ✉ PhD, Main Expert, FSBI «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products», Moscow, Russia.

E-mail: nikitina@expmed.ru;

Zhuk I. E., Leading 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;

Kozlova T. Yu., Category 1 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.

ОСОБЕННОСТИ ИММУННОГО ОТВЕТА НА ВАКЦИНАЦИЮ ПРОТИВ КОРИ У СЕРОНЕГАТИВНЫХ ВЗРОСЛЫХ

© 2019 г. М. А. Смердова, Ю. Ю. Андреев, А. П. Топтыгина*

*E-mail: toptyginaanna@rambler.ru

ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г. Н. Габричевского» Роспотребнадзора, Москва, Россия

Поступила: 23.02.2019. Принята: 06.03.2019

Обследованы 100 здоровых взрослых в возрасте 18–30 лет на наличие противокоревых антител. У 32% обнаружен защитный уровень противокоревых антител, у 68% таких антител не выявлено. Специфический клеточный иммунитет к антигенам вирусов кори выявлен у 57,37% обследованных лиц, у 26,07% – специфического клеточного иммунитета к вирусам кори обнаружено не было, а у 6,56% – ответ был расценен как сомнительный. Серонегативные были привиты вакциной коревой культуральной живой («Вектор», Россия). Через 6 недель у всех привитых были выявлены противокоревые антитела защитного уровня, средний уровень 2,18 (1,40–3,68) МЕ/мл. Специфический клеточный иммунитет к антигенам вирусов кори у 3 человек был расценен как сомнительный, у остальных привитых как положительный.

Ключевые слова: вакцинация, корь, антитела, клеточный иммунитет, серонегативные

DOI: 10.31857/S102872210006485-8

Адрес: 125212, Россия, Москва, ул. Адмирала Макарова 10, МНИИЭМ им. Г. Н. Габричевского, Топтыгина Анна Павловна. Тел.: +7(495) 452-18-01, моб.: +7(916) 389-66-04; Факс: +7(495) 452-18-30.

E-mail: toptyginaanna@rambler.ru

Авторы:

Смердова М. А., аспирант лаборатории цитокинов ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г. Н. Габричевского» Роспотребнадзора, Москва, Россия;

Андреев Ю. Ю., аспирант лаборатории цитокинов ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г. Н. Габричевского» Роспотребнадзора, Москва, Россия;

Топтыгина А. П., д.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории цитокинов ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г. Н. Габричевского» Роспотребнадзора, Москва, Россия.

На фоне проводимой в рамках программы ВОЗ по элиминации кори массовой вакцинации от этой инфекции, на первый план стали выступать такие проблемы, как заболеваемость среди взрослых, и даже привитых в детстве. Так в Италии в 2017 г. вспышка кори охватила 4500 человек и 70% заболевших составили люди в возрасте 15–30 лет [1]. Проведенное нами ранее исследование выявило значимое снижение до 45% лиц, имеющих защитные уровни противокоревых

антител в возрастной группе 18–30 лет [2]. Исходя из вышесказанного, целью настоящего исследования было проанализировать формирование специфического гуморального и клеточного иммунного ответа на вакцинацию против вирусов кори у изначально серонегативных взрослых в возрасте 18–30 лет.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследовании принимали участие 100 здоровых взрослых в возрасте от 18 до 30 лет. Работа была одобрена локальным этическим комитетом ФБУН МНИИЭМ им. Г. Н. Габричевского, обследованные подписывали информированное согласие на участие в исследованиях. Взятие биологического материала проводили из локтевой вены в количестве 4 мл в пробирки с гелем и с гепарином натрия. Полученную центрифугированную сыворотку разливали в пробирки Эппендорф, и хранили при -70°C до использования. Специфические противокоревые IgG-антитела определяли методом ИФА (тест-система «ВектоКорь IgG» фирмы Вектор-Бест (Россия). Защитным уровнем IgG для кори считали показатель 0,2 МЕ/мл. Для оценки специфического клеточного иммунитета к антигенам вируса кори

фракцию мононуклеаров выделяли центрифугированием на градиенте плотности. Лимфоциты культивировали в полной сывороточной среде RPMI-1640 с добавлением, или без (контроль) антигенов вирусов кори при 37 °С в атмосфере 5% CO₂ и 100% влажности. Клетки окрашивали FITC-мечеными антителами к CD8 и CD107a-PE-Cy5, анализировали на проточном цитометре FACSCantoII (технологии и программное обеспечение Becton Dickinson, США) и подсчитывали процент дважды положительных клеток, которые соответствовали дегранулировавшим цитотоксическим Т-лимфоцитам, распознавшим коревой антиген. Уровень спонтанной дегрануляции не превышал 1% [3]. Все обследованные лица, не имевшие защитных уровней противокоревых антител были привиты вакциной коревой культуральной живой («Вектор», Россия, серия M231, годность 11.2019), согласно инструкции 0,5 мл подкожно однократно. Через 6 недель после вакцинации, у этих людей было проведено повторное исследование уровня специфических антител и специфического клеточного иммунитета против вирусов кори. Полученные результаты были подвергнуты статистической обработке с вычислением медианы, первой и третьей квартили для анализа уровня антител и средней и ее ошибки для анализа клеточного иммунитета. Уровень $p < 0,05$ считали значимым.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Среди обследованных лиц 32% имели защитные уровни противокоревых антител, а 68% либо не имели противокоревых антител (55 человек), либо имели следы антител ниже защитного уровня (13 человек). При этом 28 человек не имели сведений о прививках, а 40 человек были привиты в детстве от кори. Специфический клеточный иммунитет к антигенам вирусов кори был выявлен у 57,37% обследованных лиц, тогда как у 26,07% специфического клеточного иммунитета к вирусам кори обнаружено не было, а у 6,56% ответ был расценен как сомнительный. Все 68 человек, не имевших защитных антител против кори подлежали вакцинации, однако 7 человек по разным причинам на прививку не пришли и выбыли из исследования на этом этапе. Провакцинированы от кори были 61 человек. Через 6 недель после прививки повторно был исследован специфический гуморальный и клеточный иммунитет к вирусу кори у привитых. К сожалению, на этом этапе не явились на обследование 14 человек. В связи с этим эффек-

тивность вакцинации оценивали по результатам анализа 47 человек. В результате исследования выявлено, что средний уровень антител против вируса кори выше защитного уровня и составляет 2,18 (1,40–3,68) МЕ/мл (Me (LQ-UQ)). Все привитые выработали защитные уровни специфических противокоревых антител. Специфический клеточный иммунный ответ на антигены вируса кори был обнаружен у 44 из 47 обследованных людей. У 3 человек специфический клеточный иммунный ответ был расценен как сомнительный (до вакцинации эти люди не имели специфического клеточного иммунного ответа на антигены кори). Интересно, что люди, не имевшие до вакцинации специфического клеточного иммунного ответа на антигены вируса кори и те, чей ответ был исходно расценен как сомнительный, после вакцинации продемонстрировали хороший уровень специфического клеточного иммунного ответа (2,3%), по уровню равный тому, который был у тех лиц, которые исходно имели клеточный иммунный ответ к вирусам кори. Группа обследованных, имевших специфический клеточный иммунный ответ к антигенам вируса кори еще до вакцинации, продемонстрировала значимое повышение (3,25%) этого показателя после вакцинации ($p < 0,05$). Важно отметить, что из 3 человек, продемонстрировавших сомнительный уровень специфического клеточного иммунного ответа после вакцинации, один имел также невысокий, но вполне защитный уровень антител, тогда как два других продемонстрировали, напротив высокий уровень противокоревых антител. Полученные результаты позволяют думать, что клеточный и гуморальный иммунный ответ против вирусов кори формируются независимо друг от друга и сохраняются многие годы также независимо, внося каждый свой вклад в защиту организма от инфекции.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. *Filia A., Bella A., Del Manso M., Baggieri M., Magurano F., Rota M. C.* Ongoing outbreak with well over 4,000 measles cases in Italy from January to end August 2017 – what is making elimination so difficult? *Euro Surveill*, 2017, 22(37), 30614.
2. *Топтыгина А. П., Смердова М. А., Наумова М. А., Владимирова Н. П., Мамаева Т. А.* Влияние особенностей популяционного иммунитета на структуру заболеваемости корью и краснухой. *Инфекция и иммунитет*, 2018, 8(3), 341–348. [*Toptygina A. P., Smerdova M. A., Naumova M. A., Vladimirova n.p., Mamaeva T. A.* Influence of population immunity peculiarities on the structure of measles and rubella prev-

- alence. Russian Journal of Infection and Immunity, 2018, 8(3), 341–348].
3. *Топтыгина А. П., Семикина Е. Л., Алешкин В. А.* Формирование и поддержание специфического клеточного ответа на вакцинацию «Приорикс».

Иммунология, 2013, 34(5), 257–261. [*Топтыгина А. П., Семикина Е. Л., Алишкин В. А.* The shaping and the maintenance of T-cell specific immune response to vaccination Priorix. Immunology (Russ), 2013, 34(5), 257–261.]

PECULIARITIES OF IMMUNE RESPONSE TO MEASLES VACCINATION IN SERONEGATIVE ADULTS

© 2019 **М. А. Smerdova, Yu. Yu. Andreev, A. P. Toptygina***

*E-mail: toptyginaanna@rambler.ru

G. N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia

Received: 23.02.2019. **Accepted:** 06.03.2019

100 healthy adults aged 18–30 years were examined for the presence of measles immunity. A protective level of measles antibodies was found in 32%, and in 68% of adults such antibodies were not detected. Specific cellular immunity to measles virus antigens was detected in 57.37% of the examined individuals, in 26.07% of them specific cellular immunity to measles viruses was not detected, and in 6.56% the response was regarded as equivocal. Seronegative adults were vaccinated with measles cultural live vaccine (“Vector”, Russia). After 6 weeks, protective levels of anti-measles antibodies were detected in all vaccinated patients, the average level was 2.18 (1.40–3.68) IU/ml. Specific cellular immunity to antigens of measles viruses in 3 people was regarded as equivocal, in the rest of the vaccinated as positive.

Key words: vaccination, measles, antibodies, cellular immunity, seronegative

Authors:

Smerdova M. A., ✉ PhD Student, Laboratory of Cytokines, G. N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia. **E-mail:** toptyginaanna@rambler.ru;

Andreev Yu. Yu., PhD Student, Laboratory of Cytokines, G. N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia;

Toptygina A. P., PhD, MD (Medicine), Leading Research Associate, Laboratory of Cytokines, G. N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia.

ИССЛЕДОВАНИЕ ИММУНОГЕННОСТИ ДНК-ВАКЦИННЫХ КОНСТРУКЦИЙ, КОДИРУЮЩИХ ИСКУССТВЕННЫЕ АНТИГЕНЫ ВИРУСА ГРИППА

© 2019 г. **Е. В. Старостина***, **О. Н. Каплина**, **Л. И. Карпенко**,
С. Г. Дудко, **С. И. Бажан**

*E-mail: starostina_ev@vector.nsc.ru

ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»
Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, НСО, Россия

Поступила: 15.03.2019. Принята: 28.03.2019

Создание универсальной вакцины против гриппа является актуальной задачей. Одним из подходов к созданию универсальной вакцины против гриппа является конструирование искусственных иммуногенов, содержащих консервативные фрагменты (эпитопы) белков различных субтипов вируса гриппа. Ранее в ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» были сконструированы ДНК-вакцинные конструкции – кандидаты универсальной вакцины против вируса гриппа А, кодирующие искусственные антигены, сконструированные на основе консервативных фрагментов стебля гемагглютинина вируса гриппа А двух подтипов H1N1 и H3N2, а также консервативного белка М2. В данной статье представлены результаты по исследованию Т-клеточного иммунного ответа у мышей, иммунизированных ДНК-вакцинными конструкциями, кодирующими спроектированные антигены вируса гриппа.

Ключевые слова: вирус гриппа, универсальная вакцина, ДНК-вакцина, искусственный белок-иммуноген

DOI: 10.31857/S102872210006484-7

Адрес: 630559, ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия, Старостина Екатерина Владимировна.

Тел.: 8 (383) 363-47-10, 8 913 937 5205 (моб.).

E-mail: starostina_ev@vector.nsc.ru

Авторы:

Старостина Е. В., н.с. отдела биоинженерии ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, НСО, Россия;

Каплина О. Н., с.н.с. отдела биоинженерии ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, НСО, Россия;

Карпенко Л. И., д.б.н., заведующий лабораторией рекомбинантных вакцин отдела биоинженерии ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, НСО, Россия;

Дудко С. Г., стажер-исследователь отдела биоинженерии ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, НСО, Россия;

Бажан С. И., д.б.н., заведующий теоретического отдела ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, НСО, Россия.

АКТУАЛЬНОСТЬ И ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Грипп является сезонным инфекционным заболеванием, широко распространенным по всему земному шару. Вакцинация считается одним

из самых эффективных средств профилактики гриппа. Однако постоянная изменчивость вируса гриппа позволяет ему уходить от специфического иммунитета, сформировавшегося у человека в результате ранее перенесенной инфекции или предшествующей вакцинации предыдущими вариантами вируса. Это приводит к тому, что состав гриппозной вакцины необходимо менять каждые 2–3 года. Поэтому актуальной задачей является создание вакцин, способных индуцировать иммунный ответ против широкого спектра различных штаммов вируса гриппа человека и штаммов вируса гриппа птиц, также способных вызывать заболевания у людей.

Работы по созданию универсальной гриппозной вакцины ведутся по нескольким основным направлениям, в том числе на основе консервативных белков или консервативных участков переменных поверхностных гликопротеинов методами обратной генетики [1], а также на основе вирусоподобных частиц [2] и рекомбинантных вирусных векторов [3, 4]. Многие из

экспериментальных вакцин показали положительные результаты на животных, некоторые из них проходят доклинические или клинические испытания. Однако остается много нерешенных проблем, связанных с иммуногенностью вакцины и её способностью обеспечивать защиту от широкого спектра субтипов вируса гриппа. Один из перспективных подходов к созданию универсальных вакцин против инфекционных заболеваний, таких как грипп, основан на конструировании искусственных полиэпитопных иммуногенов, спроектированных с использованием консервативных Т- и В-клеточных эпитопов различных вирусных белков.

Во ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» в рамках проекта РНФ № 15-15-00047 проведен дизайн и конструирование трех вариантов ДНК-вакцинных конструкций – кандидатов универсальной вакцины против вируса гриппа А, кодирующих один нативный и два искусственных белка-иммуногена. Искусственные иммуногены AgН1 и AgН3 спроектированы на основе консервативных фрагментов стебля гемагглютинина двух разных субтипов вируса гриппа (Н1N1 и Н3N2, соответственно), тогда как нативный иммуноген AgМ2 – на основе консервативного вирусного белка М2.

Целью данной работы явилась оценка Т-клеточного иммунного ответа у животных, иммунизированных ДНК-вакцинными конструкциями, кодирующими спроектированные антигены вируса гриппа.

ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ МЕТОДЫ

Для иммунизации использовались мыши BALB/с, самки весом 16–18 г. Иммунизация проводилась внутримышечно трёхкратно с интервалом две недели (доза 100 мкг ДНК на мышь). Через две недели после третьей иммунизации у иммунизированных мышей забирали селезёнки, из которых выделяли спленоциты и стимулировали их синтетическими пептидами, соответствующими эпитопам, входящих в состав спроектированных иммуногенов. Для оценки Т-клеточного иммунного ответа использовали два метода: метод внутриклеточного окрашивания цитокинов (ICS) с использо-

ванием цитофлуориметра FACSCalibur и метод IFN- γ ELISpot с использованием набора Becton Dickinson (США).

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

Данные полученные с помощью метода IFN- γ ELISpot показали, что в группе животных, иммунизированных комбинацией ДНК-вакцинных конструкций наблюдался статистически значимый ответ CD8⁺ Т-лимфоцитов. При этом данные, полученные с помощью метода ICS, показали, что спроектированные вакцинные конструкции индуцируют статистически значимые ответы CD8⁺ Т-лимфоцитов, продуцирующих как IFN- γ , так и IL-2.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, полученные результаты показали, что ДНК-вакцинные конструкции, кодирующие искусственные антигены вируса гриппа, обладают способностью индуцировать Т-клеточный иммунный ответ, специфичный в отношении вируса гриппа.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда, грант 15-15-00047.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Wacheck V., Egorov A., Groiss F., Pfeiffer A., Fuederer T., Hoeflmayer D., Kundi M., Popow-Kraupp T., Redlberger-Fritz M., Mueller C.A., Cinatl J., Michaelis M., Geiler J., Bergmann M., Romanova J., Roethl E., Morokutti A., Wolschek M., Ferko B., Seipelt J., Dick-Gudenus R., Muster T. A novel type of influenza vaccine: safety and immunogenicity of replication-deficient influenza virus created by deletion of the interferon antagonist NS1. *J Infect Dis.* 2010, 1; 201(3), 354–62.
2. López-Macías C. Virus-like particle (VLP)-based vaccines for pandemic influenza: performance of a VLP vaccine during the 2009 influenza pandemic. *Hum Vaccin Immunother.* 2012, 8(3), 411–4.
3. Draper S. J., Cottingham M. G., Gilbert S. C. Utilizing poxviral vectored vaccines for antibody induction: progress and prospects. *Vaccine* 2013, 31, 4223–30.
4. Vemula S. V., Ahi Y. S., Swaim A. M., Katz J. M., Donis R., Sambhara S., Mittal S. K. Broadly protective adenovirus-based multivalent vaccines against highly pathogenic avian influenza viruses for pandemic preparedness. *PLoS One* 2013, 8, 624–96.

IMMUNOGENICITY OF DNA VACCINE CONSTRUCTS ENCODING INFLUENZA VIRUS ARTIFICIAL ANTIGENS

© 2019 E. V. Starostina*, O. N. Kaplina, L. I. Karpenko,
S. G. Dudko, S. I. Bazhan

*E-mail: starostina_ev@vector.nsc.ru

State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector» Rospotrebnadzor,
Koltsovo, Novosibirsk region, Russia

Received: 15.03.2019. Accepted: 28.03.2019

Development of a universal influenza vaccine is an important task. One of approaches for develop a universal influenza vaccine is design of artificial immunogens, which consist of fragments from proteins of different subtypes of influenza virus. Candidate universal DNA-vaccine were design in the FBSI SRC VB «Vector» earlier. The vaccine encode artificial antigens designed on the basis of conservative fragments of the hemagglutinin stem from influenza A virus of two subtypes H1N1 and H3N2, and on the basis of conservative protein M2. The article presents results of a study of the T-cell immune response in mice that were immunized with DNA-vaccine constructs encoding the designed influenza virus antigens.

Key words: influenza virus, «universal vaccine», DNA vaccine, artificial protein-immunogen

Authors:

Starostina E. V., ✉ researcher of Bioengineering Department, State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector» Rospotrebnadzor, Koltsovo, Russia. **E-mail:** starostina_ev@vector.nsc.ru;

Kaplina O. N., researcher of Bioengineering Department, State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector» Rospotrebnadzor, Koltsovo, Russia;

Karpenko L. I., PhD, Dr. Sci., head of Recombinant vaccines Laboratory of Bioengineering Department, State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector» Rospotrebnadzor, Koltsovo, Russia;

Dudko S. G., researcher of Bioengineering Department, State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector» Rospotrebnadzor, Koltsovo, Russia;

Bazhan S. I., PhD, Dr. Sci., head of Theoretical Department, State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector» Rospotrebnadzor, Koltsovo, Russia.

Раздел 4
ПЕРВИЧНЫЕ
ИММУНОДЕФИЦИТЫ

ВОПРОСЫ СОЦИАЛИЗАЦИИ ПАЦИЕНТОВ С ПИД

© 2019 г. Е. В. Зайцева^{1*}, М. А. Болков^{1,2}, Л. И. Воронина¹

*E-mail: katia_zai@mail.ru

¹Уральский федеральный университет им. первого Президента России Б. Н. Ельцина, Екатеринбург, Россия;

²Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, Екатеринбург, Россия

Поступила: 15.03.2019. Принята: 27.03.2019

Расширение научных и клинических знаний о первичных иммунодефицитах позволяет диагностировать пациентов с ПИД в более ранних возрастах. Благодаря этому пациенты получают возможность прожить полноценную и долгую жизнь. Это обстоятельство актуализирует необходимость решения проблем, возникающих в социализации детей и подростков с ПИД. Перед обществом стоит задача: создать для таких детей условия для получения образования, освоения навыков социальных коммуникаций, при этом минимизировать риски психологических травм, связанных с побочными эффектами заболевания.

Ключевые слова: социализация, первичные иммунодефициты, пациенты, дети

DOI: 10.31857/S102872210006483-6

Адрес: Россия, ул. Мира, д. 19, Уральский федеральный университет им. первого Президента России Б. Н. Ельцина, Зайцева Екатерина Васильевна. Тел.: +79222136373 (моб.)

E-mail: katia_zai@mail.ru

Авторы:

Зайцева Е. В., к. соц. н., доцент, Уральский федеральный университет им. первого Президента России Б. Н. Ельцина, Екатеринбург, Россия;

Болков М. А., к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории иммунологии воспаления Института иммунологии и физиологии УрО РАН; старший научный сотрудник Уральского федерального университета им. первого Президента России Б. Н. Ельцина Екатеринбург, Россия;

Воронина Л. И., к. соц. н., доцент, Уральский федеральный университет им. первого Президента России Б. Н. Ельцина, Екатеринбург, Россия.

Сегодня в обществе и научной среде проявляется интерес к социальным аспектам медицины. Однако в настоящее время недостаточно работ российских и зарубежных авторов, которые анализируют проблемы социализации пациентов с врожденными заболеваниями, в том числе с первичными иммунодефицитами (ПИД). Именно это обстоятельство определяет актуальность данного исследования. Стоит отметить, что локус научного внимания все больше смещается на изучение проблем социализации пациентов младшей возрастной группы.

Целью настоящего исследования, результаты которого отражены в статье, является изучение

специфики социализации пациентов с первичными иммунодефицитами, а также разработки рекомендаций. Для реализации исследовательских задач авторами статьи использованы методы анализа теоретической литературы, а также 15 глубинных интервью, проведенных с членами пациентских организаций (родителями больных детей с первичным иммунодефицитом).

По данным Национальной ассоциации экспертов в области первичных иммунодефицитов в Российской Федерации ежегодно рождается 250 детей с ПИД. Часто при диагностике, лечении и реабилитации этой группы пациентов возникают различные проблемы, во многом обусловленные широким спектром клинических симптомов, характерных для этого сложного заболевания. Прежде всего, это проблемы в постановке диагноза, на что часто уходит драгоценное время для принятия решения по выбору вариантов лечения: иногда месяцы или годы от первых признаков заболевания до подтверждения диагноза, а во многих случаях — до назначения инвалидности. С этого момента для больного и членов семьи наступает сложное время для осознания, принятия заболевания и научения жить по новым правилам. И по мере взросления у пациентов появляются многочисленные проблемы, связанные с социализацией.

Социализация представляет собой процесс взаимодействия, в результате которого происходит освоение индивидом социальных норм поведения и социокультурных ценностей, принятие которых позволяет ему успешно функционировать в обществе. Как правило, процесс социализации принято делить на два этапа – периоды первичной и вторичной социализации [1]. Первичная социализация начинается с рождения индивида и протекает первую треть его жизни до формирования «зрелой личности». Вторичная социализация происходит во взрослой жизни.

Первичная социализация происходит непосредственно в семье. Кажется, что первичную социализацию проходят и здоровый, и ребенок с диагнозом ПИД одинаково. Однако уже на первоначальном этапе процессы социализации у них идут по-разному. Родители, имеющие ребенка с ПИД, понимая серьезность проблем в воспитании такого ребенка, осознано или подсознательно ограждают его не только от нежелательных контактов, подчас опасных для жизни, но и от познавательной деятельности. В то же время родители, имеющие ребенка с диагнозом ПИД, часто не имеют возможности полноценно заниматься социализацией ребенка, так как в основном вынуждены заниматься лечением, решать первоочередные задачи, необходимые для его выживания, а также созданием безопасных условий для жизнедеятельности. Например, многие родители вынуждены решать такие задачи, как получение диагноза или инвалидности, что позволит им впоследствии получать адекватное лечение, «выбивать» необходимые лекарства, сопровождать ребенка в больнице, в отделении иммунологии и реабилитационном центре.

По мере взросления такая группа детей ощущает влияние социальной изоляции. Соответственно у них не усваиваются социальные роли и не формируются навыки общения во всем многообразии социального мира, или этот процесс происходит частично и с опозданием. Вместо позитивного опыта детства формируется богатый, но печальный опыт, детерминированный течением болезни и борьбы с ней. Таким образом, не происходит всестороннее социальное развитие личности, так как именно социальная среда является детерминирующим фактором. На процессы социализации ребенка воздействуют факторы – носители той или иной культуры и общности, а также факторы мега-, мезо- и микроуровней. В настоящем исследовании особо значим анализ факторов микроуровня: этот уровень представлен такими факторами как члены

семьи, родственники, сверстники, учителя, детский сад, школа, различные государственные и общественные организации.

Зная специфику заболеваний пациентов с ПИД, ясно, что их взаимодействие с указанными факторами, за исключением с членами семьи, имеет лишь эпизодический характер. Например, у детей с ПИД могут быть только эпизодические контакты с представителями образовательных организаций, вследствие домашнего воспитания и образования, в процессе которого контакты пациентов с внешним миром сведены до минимума. Несмотря на воспитательно-образовательную систему РФ, где предлагаются различные формы воспитания, образования и социализации детей с ограниченными возможностями здоровья, ни коррекционные детские сады, ни школы реально не обеспечивают работу с пациентами-детьми с ПИД. Данная группа пациентов оказывается вне социальных условий воспитания и обучения. Для детей с первичными иммунодефицитами предусматривается и такая форма обучения, как надомная. Однако именно в такой ситуации наиболее остро проявляется проблема в разрыве взаимоотношений детей с обществом, изоляции от друзей, одноклассников и учителей [2]. Эти обстоятельства делают невозможной полноценную социализацию детей с диагнозом ПИД.

Таким образом, группа пациентов с ПИД является сложной в сравнении с группами других детей, также имеющих ограниченные возможности здоровья. Социализация таких пациентов представляет собой сложный процесс в силу специфики заболевания, так как профилактика рецидивов заболевания предполагает, как правило, их изоляцию от внешнего мира. С первых лет жизни, особенно с 6–7-летнего возраста, эти пациенты испытывают потребность во взаимодействии с различными агентами социализации, которая чаще всего не удовлетворяется. Для этой группы пациентов сложно реализовывать элементы инклюзивного образования (совместного обучения с обычными детьми и досугово-развлекательной деятельности) в силу рисков, возникающих для их здоровья. Однако, решение этого вопроса возможно посредством внедрения новых форм социальной работы: например, дистанционные формы обучения, создание муниципальных специализированных детских садов или групп и образовательных учреждений закрытого вида.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-29-14059

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCE

1. Бергер П., Лукман Т. Социальное конструирование реальности. Трактат по социологии знания, Москва: «Медиум», 1995, 323. [Berger P., Lukman T. Social construction of reality. A Treatise on the Sociology of Knowledge, Moscow: Medium, 1995, 323].
2. Болдина М. А., Деева Е. В. Технологии социальной работы с детьми-инвалидами. Социально-экономические явления и процессы. 2013, 11 (057), 167–173. [Boldina M. A., Deeva E. V. Technologies of social work with disabled children. Socio-economic phenomena and processes. 2013, 11 (057), 167–173].

QUESTIONS OF SOCIALIZATION OF PATIENTS WITH PID

© 2019 E. V. Zaitseva^{1*}, M. A. Bolkov^{1,2}, L. I. Voronina¹

*E-mail: katiya_zai@mail.ru

¹Ural federal university of first President of Russia B. N. Yeltsin, Yekaterinburg, Russia;²Institute of immunology and physiology, Ural branch of the Russian academy of sciences, Yekaterinburg, Russia

Received: 15.03.2019. Accepted: 27.03.2019

Expanding scientific and clinical knowledge of primary immunodeficiencies allows diagnosing patients with primary immunodeficiencies at earlier ages. Thanks to this, patients get the opportunity to live a full and long life. This circumstance actualizes the need to solve problems arising in the socialization of children and adolescents with PID. It is necessary to create conditions for such children to receive education, to master the skills of social communication, while minimizing the risks of psychological trauma associated with the side effects of the disease. Solving the problems of socialization of children and children with PIDs who have limited health capabilities becomes relevant.

Key words: socialization, primary immunodeficiency, patients, children

Authors:

Zaitseva E. V., ✉ candidate of sociological sciences, associate professor, Ural Federal University first President of Russia B. N. Yeltsin Yekaterinburg, Russia. **E-mail:** katiya_zai@mail.ru;

Bolkov M. A., candidate of medical sciences, researcher of Laboratory of Immunology, Inflammation, Institute of immunology and physiology, Ural branch of the Russian Academy of sciences, Yekaterinburg, Russia;

Voronina L. I., candidate of sociological sciences, associate professor, Ural Federal University first President of Russia B. N. Yeltsin, Yekaterinburg, Russia.

СКРИНИНГ НА НАСЛЕДСТВЕННЫЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ: БЕГЛЫЙ ВЗГЛЯД НА ОТЕЧЕСТВЕННЫЙ И ЗАРУБЕЖНЫЙ ОПЫТ ПРАВОВОГО РЕГУЛИРОВАНИЯ

© 2019 г. А. В. Нечкин

E-mail: super.nechkin@gmail.com

*ФГБОУ «Уральский государственный юридический университет»,
Екатеринбург, Россия*

Поступила: 12.03.2019. Принята: 25.03.2019

Отечественному законодательству известно понятие генодиагностика, однако важнейшие вопросы, связанные с ее проведением (о разрешенных и запрещенных к проведению разновидностях генодиагностики, о гарантиях не дискриминации и конфиденциальности по итогам таковой процедуры, о судьбе генетических образцов остающихся после нее), остаются не урегулированными. В рамках данной статьи автор рассматривает примеры нормативного регулирования упомянутых вопросов в зарубежных государствах, предлагая разумно использовать зарубежный опыт.

Ключевые слова: скрининг, неонатальный скрининг, генетика, генодиагностика, геном человека, наследственные заболевания, Конституция РФ, право на охрану здоровья и медицинскую помощь

DOI: 10.31857/S102872210006482-5

Адрес: 620034, г. Екатеринбург, ул. Колмогорова, д.54, ФГБОУ «Уральский государственный юридический университет», кафедра конституционного права, Нечкин Андрей Вадимович. Тел. +79049893112.

E-mail: super.nechkin@gmail.com

Автор:

Нечкин А. В., к.ю.н., старший преподаватель кафедры конституционного права ФГБОУ «Уральский государственный юридический университет», Екатеринбург, Россия.

На сегодняшний день медицине уже стали доступны эффективные способы лечения некоторых видов наследственных заболеваний, позволяющие избежать летального исхода с одновременным предотвращением развития тяжелой инвалидности, при условии, что заболевание выявлено до начала его клинических проявлений. Самый простой и перспективный метод для раннего обнаружения таких болезней, по мнению специалистов медиков – массовое обследование беременных женщин – пренатальный скрининг и новорожденных или неонатальный скрининг [1, 2]. Легальное определение скрининга на наследственные заболевания в его различных разновидностях, как в отечественном, так и в зарубежном законодательстве, как правило, отсутствует. Чего нельзя сказать о более общем по отношению к нему понятии – генодиагностика.

В России понятие генодиагностика закрепляется в федеральном законе от 5 июля 1996 г. № 86-ФЗ «О государственном регулировании в области генно-инженерной деятельности», который в первоочередной редакции содержал категорическую оговорку о том, что его положения не применяются к человеку, которая, впрочем, с течением времени была смягчена оговоркой касательно, интересующей нас, генодиагностики (совокупности методов по выявлению изменений в структуре генома), но без внедрения даже минимально необходимого объема правового регулирования. Действующий федеральный закон от 3 декабря 2008 г. № 242-ФЗ «О государственной геномной регистрации в РФ» жестко ограничивает сферу своего действия сугубо криминологической целью – идентификацией личности человека, для которой необходим минимальный объем получаемой и хранимой генетической (геномной) информации, а также крайне специфический круг субъектов, имеющих право на ее легальное использование. Тем самым данный закон на данный момент не закрывает пробел в действующем правовом регулировании генодиагностики.

На момент написания данной статьи на общественное обсуждение был вынесен проект феде-

рального закона «О внесении изменений в ст. 11 федерального закона «О персональных данных» и ст. 39.1 закона Российской Федерации «О защите прав потребителей», предусматривающий расширение понятия биометрические персональные данные, за счет отнесения к ним еще и сведений, характеризующих генетические особенности человека, а также предполагающий расширение сферы действия упомянутого нами выше федерального закона «О государственной геномной регистрации в РФ» на обработку такого рода персональных данных. По нашему мнению, такого рода уточнение понятия персональных данных назрело уже довольно давно, однако предложенные изменения не ликвидируют пробел в правовом регулировании генодиагностики в России. Так, в частности, открытым остается вопрос о разрешенных и запрещенных к проведению на территории России разновидностях генодиагностики, о гарантиях не дискриминации и конфиденциальности по итогам таковой процедуры, а также о судьбе генетических образцов остающихся после нее.

В зарубежных государствах ситуация обстоит несколько иначе и существуют примеры довольно подробного регулирования порядка проведения генодиагностики, которые вполне могут стать ориентиром для совершенствования отечественного законодательства по данному вопросу.

Касательно разрешенных и запрещенных к проведению разновидностях генодиагностики законодательство зарубежных государств демонстрирует разнообразие подходов. Так, например, в ФРГ генетический тест может проводиться только с целью выявления заболеваний, которые можно предотвратить или вылечить, под запретом находятся тайные тесты по определению отцовства, тесты на раннее определение пола ребенка, а также тесты на выявление заболеваний, которые могут появиться у еще не рожденного ребенка в зрелом возрасте. В Латвии запрещается проводить исследование генома умершего человека. В США в некоторых штатах тайные генетические тесты на установление отцовства прямо разрешены (Невада), однако есть и штаты, где таковые тесты запрещены (Нью-Джерси). Кроме того, в США есть примеры штатов, где под запретом находится проведение скрининга новорожденных на наследственные заболевания (неонатальный скрининг) с применением технологии секвенирования ДНК целого генома (Нью-Гэмпшир).

Обсуждая гарантии не дискриминации по итогам генодиагностики, необходимо сразу отметить, что в зарубежных государствах, данный институт является достаточно нормативно развитым, особенно в части трудовых отношений и отношений по страхованию жизни и здоровья. В ФРГ работодатель не должен проводить дискриминацию в отношении работников по причине их генетических характеристик и не вправе требовать результата такого теста при найме на работу. Однако, генетические тесты могут включаться в периодические медосмотры у работников с вредными условиями труда, для предотвращения тяжелых заболеваний. Страховые компании не имеют права требовать результатов генетических тестов от клиентов, если сумма выплаты не превышает 300 000 евро одновременно или 30 000 евро в виде ежегодной пенсии. В США по части гарантий не дискриминации по итогам генодиагностики опять наблюдается разнообразие подходов. В большинстве случаев законодатель стоит на стороне интересов человека. Так, например, работодатели, агентства по трудоустройству или профсоюзные организации не могут использовать информацию о генетическом тестировании, генетическом консультировании или генетическом заболевании для каких либо целей (Вермонт, Айова). Запрещается дискриминация со стороны страховщика в отношении лица на основании генетического анализа или генетической склонности (Нью-Мексико, Айдахо, Оклахома). Однако, в отдельных штатах делается исключение из общего правила. Так, например, страховщик не может получать результаты генетического тестирования без отдельного письменного согласия физического лица, но он не несет ответственности за непреднамеренное получение результатов (Индиана).

Несколько слов также следует сказать о гарантиях конфиденциальности по итогам генодиагностики, а также о судьбе генетических образцов остающихся после ее проведения. В Латвии установлено обязательное кодирование любой генетической информации, которая хранится исключительно в единой общегосударственной базе данных. Аналогичные нормы касательно обязательного кодирования генетической информации существуют и в ряде штатов США (Мэн, Миссури, Индиана, Миннесота, Мичиган). В ФРГ, при отсутствии согласия лица на иное, такого рода информация хранится 10 лет и уничтожается. По требованию лица результаты могут уничтожаться немедленно. Генетиче-

ский образец может использоваться только для целей, для которых он был получен и должен быть уничтожен немедленно, как цель была достигнута. В США в большинстве штатов по данному вопросу наблюдается практически полное совпадение подходов, исключение составляет лишь вопрос возможного анонимного использования образцов в научных целях, которое прямо разрешено в отдельных штатах, например, в Делавэре.

Резюмируя все вышесказанное необходимо отметить, что в Российской Федерации неурегулированными остаются вопросы о разрешенных и запрещенных к проведению разновидностях генодиагностики, о гарантиях не дискриминации и конфиденциальности по итогам таковой процедуры, а также о судьбе генетических образцов остающихся после нее. Подобная ситуация негативно сказывается на реализации конституционных прав и свобод человека и гражданина и требует скорейшего нормативного решения путем принятия единого комплексного федерального закона о геноме человека, разра-

ботанного, в том числе, с учетом имеющегося позитивного зарубежного опыта правового регулирования.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-29-14059.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. *Захарова Е. Ю.* Программы массового скрининга: технические, социальные и этические вопросы / Е. Ю. Захарова // *Медицинская генетика*. 2006. № 3. С. 21–23 [Zakharova E. Yu. Mass screening programs: technical, social and ethical issues / E. Yu. Zakharova // *Medical genetics*. 2006. No. 3. p. 21–23];
2. *Баранов А. А., Альбицкий В. Ю., Иванова А. А., Терлецкая Р. Н., Косова С. А.* Тенденции заболеваемости и состояние здоровья детского населения Российской Федерации // *Российский педиатрический журнал*. 2012. № 6. С. 4–9. [Baranov A. A., Albitsky V. Yu., Ivanova A. A., Terletskaia R. N., Kosova S. A. Trends in morbidity and health status of the child population of the Russian Federation // *Russian Pediatric Journal*. 2012. № 6. p. 4–9].

SCREENING FOR HEREDITARY DISEASES: A BRIEF LOOK AT DOMESTIC AND FOREIGN EXPERIENCE IN LEGAL REGULATION

© 2019 A. V. Nechkin

E-mail: super.nechkin@gmail.com
Ural State Law University, Yekaterinburg, Russia

Received: 12.03.2019. **Accepted:** 25.03.2019

Domestic legislation is familiar with the concept of genodiagnosics, however, the most important issues related to its conduct (about permitted and prohibited to conduct varieties of genodiagnosis, guarantees of non-discrimination and confidentiality following this procedure, about the fate of genetic samples remaining after it) remain unresolved. Within the framework of this article, the author examines examples of the normative regulation of the issues mentioned in foreign countries, suggesting that foreign experience should be used wisely.

Key words: screening, neonatal screening, genetics, genetics diagnostics, human genome, hereditary diseases, Constitution of the Russian Federation, the right to health care and medical care

Author:

Nechkin A. V., PhD, senior lecturer, Department of Constitutional Law, Ural State Law University, Ekaterinburg, Russia.

РАЗВИТИЕ ТЕХНОЛОГИЙ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ И КОНСУЛЬТИРОВАНИЯ ПО ВЫЯВЛЕНИЮ ВРОЖДЕННЫХ ОШИБОК ИММУНИТЕТА: ПРОБЛЕМЫ И ПУТИ ИХ РЕШЕНИЯ

© 2019 г. И. А. Тузанкина^{1*}, Л. И. Воронина², Е. В. Зайцева²

*E-mail: ituzan@yandex.ru

¹Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, Екатеринбург, Россия;

²Уральский федеральный университет им. первого Президента России Б. Н. Ельцина, Екатеринбург, Россия

Поступила: 05.03.2019. Принята: 19.03.2019

Авторы дают теоретическое обоснование понятий «технология генетических исследований» и «технология консультирования на основе диагностики тяжелого комбинированного иммунодефицита». Рассматривают этот вид технологий как совокупность таких элементов как этические нормы, алгоритм диагностических действий и консультирования.

Ключевые слова: технологии, генетические исследования, консультирование, врожденные ошибки иммунитета, протокол, этические нормы

DOI: 10.31857/S102872210006481-4

Адрес: 620049, Екатеринбург, ул. Первомайская, 106, Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, Тузанкина Ирина Александровна. Тел.: 89122616717 (моб.).

E-mail: ituzan@yandex.ru

Авторы:

Тузанкина И. А., д.м.н., профессор, Заслуженный деятель здравоохранения РФ, главный научный сотрудник лаборатории иммунопатофизиологии Института иммунологии и физиологии УрО РАН, Екатеринбург, Россия;

Воронина Л. И., кандидат социологических наук, доцент, Уральский федеральный университет им. первого Президента России Б. Н. Ельцина, Екатеринбург, Россия;

Зайцева Е. В., к.соц.н., доцент, Уральский федеральный университет им. первого Президента России Б. Н. Ельцина, Екатеринбург, Россия.

Актуальность темы исследования, результаты которого представлены в статье, обусловлена наличием следующих теоретических и практических проблем. Это неразработанность в теории управления здравоохранением понятий «технология генетических исследований» и «технология консультирования на основе диагностики тяжелого комбинированного иммунодефицита», технологий последующего терапевтического лечения при его подтверждении. Также актуальность темы определяется отсутствием теоретического обоснования этого вида технологий, как подсистемы управления здравоохранением и совокупности элементов, входящих

непосредственно в структуру технологии. Необходимость в разработке новых технологий и их последующего внедрения в практику здравоохранения, несомненно, вызваны требованиями к повышению качества медицинской помощи на основе профессиональной компетентности врачей и развития специализаций, в том числе по иммунологии.

ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ МЕТОДЫ

В исследовании авторы используют такие методы как изучение теоретической литературы, сравнительный анализ, применяют междисциплинарный подход, интегрирующий результаты изучения теорий публичного управления, управления здравоохранением, клинической иммунологии и аллергологии, а также результаты эмпирических исследований. Анализ научных исследований позволяет сделать вывод о том, что лишь немногие российские авторы изучают и представляют теоретическое обоснование технологий, необходимых для диагностики и лечения пациентов. Практически отсутствуют работы, в которых таковые технологии рассматриваются как совокупность элементов. В основном в научных трудах анализируются отдельные элементы или факторы, влияющие на степень ре-

зультатов лечения при оказании медицинской помощи. Чаще всего к понятиям, связанным с технологиями, обращаются авторы, изучающие конкретные вопросы управления системой здравоохранения. Например, М. В. Печерских исследует процесс оказания медицинской помощи детям со злокачественными новообразованиями [1]. А. С. Позднякова рассматривает конкретные информативные диагностические методы, применяемые при лечении больных [2]. Анализируются способы и отдельные реанимационные приемы, при этом рассматриваемые не как элементы системы, а в качестве частных факторов, влияющих на результативность лечения пациента, например, В. А. Аксенова, Д. Т. Леви и Н. И. Клевно делают выводы о значимости конкретных алгоритмов, анализируемых как последовательность действий в дифференциальной диагностике БЦЖ-осложнений с включением современных информативных методов диагностики *in vivo* и *ex vivo* [3]. Наиболее разработаны технологии молекулярно-генетических исследований в теории и практике экспертно-криминалистической деятельности. В методических указаниях по реализации приказа Министерства здравоохранения России от 19.01.1999 г. указаны конкретные элементы, входящие в структуру технологии проведения судебно-медицинской экспертизы идентификации личности и установления родства [4]. Авторы статьи предлагают рассматривать технологию как подсистему управления здравоохранения и совокупность конкретных элементов: локальные акты; действия медицинских работников – участников диагностических исследований на основе норм (правовых и этических). Далее, это критерии для оценки полученных результатов и последующего принятия решений; способы, приемы и методы, применяемые при осуществлении конкретных технологий; это медицинское оборудование, тесты и лекарственные препараты. При этом, принятие решения о необходимости разработки и применения той или иной технологии, должно сопровождаться сравнительной оценкой риска и пользы, которую могут получить прямые участники (научное сообщество, врачи, пациенты, их близкие и семьи) и косвенные участники (общество и в целом государство).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исходя из предложенной методологии, в качестве примера анализируется возможность проектирования такой технологии как консуль-

тирование пациентов, проводимое педиатрами общего профиля, с целью выявления или исключения тяжелого комбинированного иммунодефицита. При проведении консультации врачи обязаны оформлять направление на генетическое обследование новорожденного ребенка, для того, чтобы выявить или исключить наследственные и врожденные заболевания. Но так как сегодня в РФ не установлен порядок проведения генетического обследования, то многие врачи не видят необходимости в том, чтобы оформлять направление на такой вид обследования. Соответственно, при бездействии врачей систематически возникает риск по задержке во времени в постановке точного диагноза заболеваний у пациентов, что приводит к неэффективному лечению. Изменить эту ситуацию частично можно следующим образом. Профессиональное сообщество должно постоянно формировать конкретные этические нормы для педиатров, не являющихся иммунологами. Это такая норма как признание необходимости по осуществлению усилий, направленных на подготовку специалистов в области генетического консультирования, а также на генетическое образование других специалистов в сфере здравоохранения [5]. Одним из результатов таких усилий может быть признание и применение на практике врачами – не иммунологами многоступенчатого экспертного диагностического протокола скрининга пациентов на наличие первичного иммунодефицита. В настоящее время благодаря усилиям международного профессионального сообщества, прежде всего, Комитета экспертов по первичным иммунодефицитам Международного союза иммунологических обществ, введено понятие «диагностический протокол скрининга пациентов на наличие первичного иммунодефицита», который систематически обновляется, внедряется в практическое здравоохранение, рекомендуется профессиональным сообществом для выявления доказанных и описанных первичных иммунодефицитов. Российские ученые также доказывают необходимость признания и применения протокола, соответственно установления алгоритма диагностических мероприятий. Например, И. А. Тузанкина, основываясь на результатах многолетних диагностических исследований, предлагает установить алгоритм конкретных действий, направленных на уточнение дефектных механизмов, лежащих в основе иммунных реакций у новорожденных детей любого гестационного возраста [6]. Применение прото-

кола скрининга и логистики сбора пятен крови, их транспортировки обработан специалистами екатеринбургского клиничко-диагностического центра «Охрана здоровья матери и ребенка» [7]. Таким образом, уточнение понятий «технология генетических исследований» и «технология консультирования на основе диагностики тяжелого комбинированного иммунодефицита» позволит в перспективе их проектировать, устанавливать нормативными актами, внедрять в практику здравоохранения, что повлечет изменение требований и к повышению качества конкретной медицинской услуги, и уровню профессиональной компетентности врачей-педиатров в сфере иммунологии.

Отчетное исследование финансировалось РФФИ в соответствии с исследовательским проектом № 18-29-14059.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCE

1. Печерских М. В. Управление процессом оказания медицинской помощи детям со злокачественными новообразованиями: Автореф. дис. на соиск. уч. степени к. мед. наук, специальность 05.13.01. «Системный анализ, управление и обработка информации (медицинские науки)». Воронеж, 2009, 29. [Pechersky M. V. Managing the process of providing medical care to children with malignant neoplasms: author. dis. on the competition uch. degree to. honey. Sciences, specialty 05.13.01. "Systems analysis, management and information processing (medical sciences)". Voronezh, 2009, 29].
2. Позднякова А. С. Туберкулез у детей и подростков: особенности заболевания, новые технологии диагностики и специфической профилактики: автореф. дис. д. мед. н., 14.01.16, специальность «Фтизиатрия». 2011, 220. [Pozdnyakova A. S. Tuberculosis in children and adolescents: features of the disease, new technologies for diagnosis and specific prevention: author. dis. D. med. n., 14.01.16, specialty «Phthisiology». 2011, 220].
3. Аксенова В. А., Леви Д. Т., Клевно Н. И. Туберкулез у детей и подростков. ГЭОТАР-Медиа, 2007, 272. [Aksenov V. A., Levi D. T., Klevno N. I. Tuberculosis in children and adolescents. GEOTAR-Media, 2007, 272].
4. Использование индивидуальных систем на основе полиморфизма длины амплифицированных фрагментов (ПДАФ) ДНК в судебно-медицинской экспертизе идентификации личности и установления родства. Методические указания № 98/253 (утв. Минздравом России 19.01.1999). [The use of individual systems based on the DNA length polymorphism of the amplified fragments (PDAF) in the forensic examination of the identification of a person and the establishment of kinship. Methodical instructions No. 98/253 (approved by the Ministry of Health of the Russian Federation on 01/19/1999)].
5. Валенсийская декларация по этическим проблемам проекта «Геном человека». Электронный фонд правовой и нормативно-технической документации. 1998. [Valencia Declaration on the ethical issues of the project "Human Genome". Electronic fund of legal and regulatory and technical documentation. 1998].
6. Тузанкина И. А., Дерябина С. С., Болков М. А., Басс Е. А., Власова Е. В., Крохалева Я. М. Первичные иммунодефициты в раннем возрасте. Екатеринбург. 2017. С. 272. [Tuzankina I. A., Deryabina S. S., Bolkov M. A., Bass E. A., Vlasova E. V., Krokhaleva Ya. M. Primary immunodeficiency at an early age. Yekaterinburg. 2017. P. 272].
7. Тузанкина И. А., Дерябина С. С., Власова Е. В., Болков М. А., Шершнев В. Н. Неонатальный скрининг на тяжелую комбинированную недостаточность в России: прекрасное далеко или завтрашняя реальность. // Вопросы современной педиатрии. 2017. Т. 16(1). С. 59–66. [Tuzankina I. A., Deryabina S. S., Vlasova E. V., Bolkov M. A., Shershnev V. N. Neonatal screening for severe combined deficiency in Russia: a beautiful far away or tomorrow's reality. // Questions of modern pediatrics. 2017. T. 16 (1). Pp. 59–66].

**DEVELOPMENT OF TECHNOLOGIES OF GENETIC RESEARCH
AND CONSULTATION ON THE IDENTIFICATION OF CONGENITAL
IMMUNITY ERRORS: PROBLEMS AND THEIR SOLUTIONS**

© 2019 I. A. Tuzankina^{1*}, L. I. Voronina², E. V. Zaitseva²

**E-mail: ituzan@yandex.ru*

*¹Institute of immunology and physiology, Ural branch of the Russian academy of sciences,
Yekaterinburg, Russia;*

²Ural federal university of first President of Russia B. N. Yeltsin, Yekaterinburg, Russia

Received: 05.03.2019. **Accepted:** 19.03.2019

The authors provide a theoretical justification for the concepts of “technology of genetic research” and “technology of counseling based on the diagnosis of severe combined immunodeficiency.” This type of technology is considered as a combination of such elements as ethical norms, an algorithm for diagnostic actions and consulting.

Key words: technologies, genetic research, counseling, inborn errors of immunity, protocol, ethical standards

Authors:

Tuzankina I. A., ☒ doctor of medical sciences, professor, Honored worker of health of the Russian Federation, chief researcher of the laboratory of immunopathophysiology, Institute of immunology and physiology, Ural branch of the Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, Russia. **E-mail:** ituzan@yandex.ru;

Voronina L. I., candidate of sociological sciences, associate professor, Ural Federal University first President of Russia B. N. Yeltsin, Yekaterinburg, Russia;

Zaitseva E. V., candidate of sociological sciences, associate professor, Ural Federal University first President of Russia B. N. Yeltsin, Yekaterinburg, Russia.

РЕГИОНАЛЬНЫЙ РЕГИСТР ПЕРВИЧНЫХ ИММУНОДЕФИЦИТОВ РЕСПУБЛИКИ БАШКОРТОСТАН

© 2019 г. Р. М. Хайруллина*, Д. Д. Прольгина, Л. Р. Кальметьева,
Г. А. Давлетбаева, И. А. Мирсаяпова, Г. У. Макарова,
Л. Г. Ибрагимова

*E-mail: imun-lab@mail.ru

ГБУЗ «Республиканская детская клиническая больница» Минздрава РБ, Уфа, Россия

Поступила: 15.03.2019. Принята: 03.04.2019

Первичные иммунодефициты (ПИД) – разнородная группа генетически детерминированных заболеваний, включающая более 330 нозологий. Раннее выявление ПИД и подбор адекватной терапии существенно улучшает прогноз заболевания, повышает качество и продолжительность жизни пациентов. Основным инструментом для решения поставленных задач является создание регистра ПИД. Региональный регистр ПИД Республики Башкортостан (РБ) создан на базе Республиканской детской клинической больницы (РДКБ) г. Уфы и к марту 2019 года включал 223 человека. В настоящее время в РДКБ г. Уфы наблюдаются 126 детей, 43 пациента переведены во взрослую сеть. Отличительными особенностями регионального регистра РБ является наличие пациентов, которым диагноз ПИД установлен на аутопсии, а также отсутствие больных с синдромом Ниймиген. Решение вопросов, связанных с диагностикой и лечением ПИД, возможно лишь при государственной поддержке и совместной работе врачей различных специальностей.

Ключевые слова: регистр, первичный иммунодефицит, диагностика, лечение

DOI: 10.31857/S102872210006480-3

Адрес: 450106, Уфа, ул. Степана Кувыкина 98, ГБУЗ «Республиканская клиническая больница» Минздрава РБ, иммунологическая лаборатория с отделением клинической иммунологии, Хайруллина Раиса Масгутовна.

Тел.: +7(347) 2290839; E-mail: imun-lab@mail.ru

Авторы:

Хайруллина Р. М., профессор, д.м.н., заведующая иммунологической лабораторией с отделением клинической иммунологии ГБУЗ «Республиканская детская клиническая больница» Минздрава РБ; главный внештатный детский иммунолог Минздрава РБ, Уфа, Россия;

Прольгина Д. Д., к.м.н., врач аллерголог-иммунолог, ГБУЗ «Республиканская детская клиническая больница» Минздрава РБ, Уфа, Россия;

Кальметьева Л. Р., к.м.н., врач аллерголог-иммунолог, ГБУЗ «Республиканская детская клиническая больница» Минздрава РБ, Уфа, Россия;

Давлетбаева Г. А., к.м.н., врач аллерголог-иммунолог, ГБУЗ «Республиканская детская клиническая больница» Минздрава РБ, Уфа, Россия;

Мирсаяпова И. А., к.м.н., врач аллерголог-иммунолог, ГБУЗ «Республиканская детская клиническая больница» Минздрава РБ, Уфа, Россия;

Макарова Г. У., к.м.н., заведующая аллергологическим отделением ГБУЗ «Республиканская детская клиническая больница» Минздрава РБ, Уфа, Россия;

Ибрагимова Л. Г., врач аллерголог-иммунолог, ГБУЗ «Республиканская детская клиническая больница» Минздрава РБ, Уфа, Россия.

Первичные иммунодефициты (ПИД) – разнородная группа генетически детерминированных заболеваний, включающая более 330 нозологий [1, 2]. Несмотря на прогресс высокотехнологичных лабораторных методик, клинические аспекты по-прежнему играют основную роль на раннем этапе диагностики ПИД [2]. Раннее выявление ПИД и подбор адекватной терапии существенно улучшают прогноз, повышают качество и продолжительность жизни пациентов [1–3].

Основным инструментом для решения поставленных задач является создание регистра ПИД [2]. Своевременное и систематическое пополнение базы данных ПИД в масштабах страны невозможно без создания и полноценной работы региональных регистров. Регистрация пациентов является основанием для создания законодательных документов, направленных на повышение качества диагностики и лечения ПИД, оценки диагностического потенциала региона, планирования мероприятий по выявлению патологии, в том числе повышения информированности по вопросам ПИД узких специалистов и врачей первичного звена [3].

Регистрация пациентов с ПИД в Республике Башкортостан (РБ) осуществляется с 1998 года на базе РДКБ г. Уфы. В 2005 году обобщены данные 72 пациентов, к марту 2019 года количество больных увеличилось до 223, данные 184 больных внесены в Национальный российский регистр.

Нозологическая структура ПИД в регистре РБ представлена следующими группами заболеваний: врожденные дефекты антителообразования – 63,6%; аутовоспалительные заболевания (АЗ) – 8,2%; комбинированные иммунодефициты с синдромальной патологией (КИД с СП) – 8,2%; нарушения клеточного и гуморального звена – 8,2%; дефекты комплемента – 4,9%; неуточненные ПИД – 4,4%; дефекты фагоцитоза – 2,2%; ПИД с иммунной дисрегуляцией (ИД) – 1,6%; ПИД уточненный – 1,1%. В настоящее время из 184 пациентов в РДКБ г. Уфы наблюдаются 126 детей, 43 переведены во взрослую сеть, умерли 15.

Гуморальные дефекты представлены селективным дефицитом иммуноглобулина А (98 человек), общей вариабельной недостаточностью (10) и агаммаглобулинемией (9). Группа АЗ включает синдром Маршалла (9), РАМ1 (1), периодическую лихорадку (3), мультифокальный остеомиелит (2). В группу КИД с СП входят синдром Вискотта-Олдрича (4), синдром Ди Джорджи (3), гипериммуноглобулинемия Е (3), синдром Луи-Бар (2), дефицит лигазы 4 (1). ТКИН установлена у 13 пациентов, врожденные дефекты системы комплемента – у 9, из них наследственный ангионевротический отек (НАО) – 3. Среди дефектов, с проявлениями в виде ИД: дефицит СТЛА – 4 (1), аутоиммунный (1) и ВЭБ-ассоциированный (1) лимфопролиферативные синдромы. Дефекты системы фагоцитоза: циклическая нейтропения (1), хроническая гранулематозная болезнь (3). В группу с уточненным ПИД входит IgG4-связанное заболевание (2).

Отличительными особенностями регионального регистра РБ являются: включение 39 пациентов (18%), которым диагноз ПИД установлен на аутопсии; отсутствие больных с синдромом Ниймиген, обусловленное национальным составом региона; семейные случаи ПИД среди

пациентов с агаммаглобулинемией, синдромом Луи-Бар, ХГБ, НАО; случай агаммаглобулинемии, верифицированной у девочки.

В пожизненной заместительной терапии высокодозными внутривенными иммуноглобулинами (ВВИГ) нуждаются 25 детей и 12 взрослых. В рамках оказания высокотехнологичной медицинской помощи на базе РДКБ проводится терапия ВВИГ в «режиме насыщения», амбулаторно – антибактериальная, противогрибковая, противовирусная, а также таргетная терапия сиролимусом, руксолитинибом, ритуксимабом, абатоцептом. Пациенты с НАО получают Беринерт. Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток проведена в условиях федеральных центров 10 пациентам с ТКИН, синдромом Вискотта-Олдрича, ИД, АЗ.

Дальнейшее совершенствование иммунологической помощи детскому населению РБ непосредственно связано с открытием в 2021 году Регионального онкогематологического Центра на базе РДКБ г. Уфы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Кузьменко Н. Б., Варламова Т. В., Мерсиянова И. В., Райкина Е. В., Бобрынина В. О., Щербина А. Ю. Молекулярно-генетическая диагностика первичных иммунодефицитных состояний. Вопросы гематологии / онкологии и иммунопатологии в педиатрии. 2016, 15 (1), 10–16. [Kuzmenko N. B., Varlamova T. V., Mersyanova I. V., Raikina E. V., Bobrynnina V. O., Shcherbina A. Yu. Molecular genetic diagnosis of primary immunodeficiencies. Pediatric Haematology / Oncology and Immunopathology, 2016, 15 (1), 10–16].
2. Щербина А. Ю., Пашанов Е. Д. Практическое руководство по детским болезням. Т. 8. Иммунология детского возраста. Медпрактика-М, М. 2006, 432 с. [Shcherbina A. Yu., Pashanov E. D. A practical guide to childhood diseases. Т. 8. Immunology of childhood. Medpraktika-M, М. 2006, 432 p.]
3. Сизякина Л. П., Андреева И. И. Создание регистра пациентов как эффективный инструмент диагностики первичных иммунодефицитов. Педиатрическая фармакология. 2013, 10 (5), 94–96. [Sizyakina L. P., Andreeva I. I. Register of Patients as an Effective Method of Diagnosing Primary Immunodeficiencies. Pediatric pharmacology. 2013, 10(5), 94–96].

**REGIONAL REGISTER OF PRIMARY IMMUNODEFICIENCIES
OF THE REPUBLIC OF BASHKORTOSTAN**

© 2019 **R. M. Khairullina***, **D. D. Prolygina**, **L. R. Kalmetyeva**, **G. A. Davletbaeva**,
I. A. Mirsayapova, **G. U. Makarova**, **L. G. Ibragimova**

**E-mail: imun-lab@mail.ru*

*Republican Children Clinical Hospital of the Ministry of Health of the Republic
of Bashkortostan, Ufa, Russia*

Received: 15.03.2019. **Accepted:** 03.04.2019

Primary immunodeficiency (PID) is a diverse group of genetically determined diseases, including more than 330 diseases. Early detection of PID and selection of adequate therapy affects the prognosis of the disease, improves the quality of life and life expectancy of patients significantly. PID register is the main tool for solving the tasks. Registration of patients with PID in the Republic of Bashkortostan (RB) is carried out on the basis of the Republican Children Clinical Hospital (RCCH) of Ufa and at March 2019, the number of registered patients increased to 223 people. Currently, 126 children are observed in the RCCH of Ufa, 43 patients have been transferred to the adult network. Distinctive features of the regional register of the RB are the presence of patients for whom the diagnosis of PID was set at autopsy and the absence of patients with Nijmegen syndrome. The solution of current problems related to the diagnosis and treatment of PID is possible only with state support and teamwork of doctors of various specialties.

Key words: registry, primary immunodeficiency, diagnosis, treatment

Authors:

Khairullina R. M., ✉ Prof., PhD, Head of the Immunology Laboratory with the Department of Clinical Immunology, Republican Children Clinical Hospital, Ministry of Health of the Republic of Bashkortostan; chief infant immunologist of the Ministry of Health of the Republic of Bashkortostan, Ufa, Russia. **E-mail:** imun-lab@mail.ru;

Prolygina D. D., PhD, allergist-immunologist, Republican Children Clinical Hospital, Ministry of Health of the Republic of Bashkortostan, Ufa, Russia;

Kalmetyeva L. R., PhD, allergist-immunologist, Republican Children Clinical Hospital, Ministry of Health of the Republic of Bashkortostan, Ufa, Russia;

Davletbaeva G. A., PhD, allergist-immunologist, Republican Children Clinical Hospital, Ministry of Health of the Republic of Bashkortostan, Ufa, Russia;

Mirsayapova I. A., PhD, allergist-immunologist, Republican Children Clinical Hospital, Ministry of Health of the Republic of Bashkortostan, Ufa, Russia;

Ibragimova L. G., allergist-immunologist, Republican Children Clinical Hospital, Ministry of Health of the Republic of Bashkortostan, Ufa, Russia;

Makarova G. U., PhD, Head of the Allergology Department of the Republican Children Clinical Hospital of the Ministry of Health of the Republic of Bashkortostan, Ufa, Russia.

Раздел 5

ДРУГИЕ ТЕМАТИКИ

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ ИММУННОГО ОТВЕТА У ЛИЦ, ПОДВЕРГШИХСЯ ХРОНИЧЕСКОМУ РАДИАЦИОННОМУ ВОЗДЕЙСТВИЮ, В ОТДАЛЁННЫЕ СРОКИ

© 2019 г. А. А. Аклеев^{1,3*}, В. С. Никифоров^{1,2}, Е. А. Блинова^{1,2},
И. И. Долгушин³

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

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

²ФГБОУ ВО «Челябинский государственный университет», Челябинск, Россия;

³ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, Челябинск, Россия

Поступила: 25.03.2019. Принята: 08.04.2019

В отдалённые сроки у облучённых людей регистрировалось снижение уровня транскрипционной активности гена NF-κB1 и повышение уровня экспрессии гена PAD4. Учитывая зависимость некоторых показателей иммунитета от уровней экспрессии генов NF-κB1 и PAD4 можно полагать, что изменения иммунитета у облучённых людей в отдалённые сроки могут быть опосредованы изменениями транскрипционной активности генов.

Ключевые слова: иммунитет, радиация, экспрессия генов

DOI: 10.31857/S102872210006479-1

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; с.н.с. лаборатории молекулярно-клеточной радиобиологии ФГБУН «Уральский научно-практический центр радиационной медицины» ФМБА России, Челябинск, Россия;

Никифоров В. С., м.н.с. лаборатории молекулярно-клеточной радиобиологии ФГБУН «Уральский научно-практический центр радиационной медицины» ФМБА России, Челябинск, Россия; аспирант кафедры радиационной биологии ФГБОУ ВО «Челябинский государственный университет», 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;

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.

Многие клеточные процессы, задействованные в поддержании генетического гомеостаза организма после облучения, включая иммунный ответ, генетически детерминированы. В ответ на малые дозы радиации и облучение с низкой мощностью дозы повышается экспрессия целого ряда генов, в том числе генов, вовлечённых в сигнальные пути, регулирующие функции различных субпопуляций лимфоцитов, секрецию цитокинов, факторов роста и других, которые позволяют облучённым клеткам и тканям восстановить генетический гомеостаз. Однако в ряде случаев повышенная экспрессия генов вовлечена в патогенез отдалённых радиационных эффектов [1], в том числе таких, как злокачественные новообразования и болезни сердечно-сосудистой системы.

Вследствие этого **целью** настоящей работы была оценка экспрессии ряда генов, участвующих в регуляции системного иммунитета, у облучённых лиц в период реализации отдалённых последствий радиационного воздействия.

Основную группу составили 58 облучённых лиц – жителей прибрежных сёл реки Течи, подвергшихся хроническому радиационному воз-

действию, группу сравнения – 50 необлучённых человек, проживавших в тех же административно-территориальных образованиях. Накопленные дозы облучения красного костного мозга (ККМ) – центрального органа иммуногенеза, в основной группе варьировали от 0,08 до 3,51 Гр ($0,75 \pm 0,08$ Гр). Обследованные лица обеих групп были представлены, главным образом, женщинами, преимущественно, пожилого возраста. Все люди, включённые в исследование, предварительно давали информированное согласие в письменном виде. Исследование проводили на базе ФГБУН «Уральский научно-практический центр радиационной медицины» ФМБА России (г. Челябинск). Для определения транскрипционной активности генов STAT3, GATA3, MAPK8, NF- κ B1 и PAD4 использовали РНК, экстрагированную из мононуклеаров периферической крови колоночным методом, на основе которой в реакции обратной транскрипции получали комплементарную ДНК (кДНК). Анализ уровня экспрессии генов проводили методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ОТ-ПЦР). Для оценки иммунного статуса у обследованных лиц в крови определяли число нейтрофилов, моноцитов, CD19⁺, CD3⁺, CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺ лимфоцитов, оценивали фагоцитарную, лизосомальную активность и интенсивность внутриклеточного кислородзависимого метаболизма нейтрофилов и моноцитов, а также содержание IgM, IgG, IgA в сыворотке крови и уровни сывороточных цитокинов (ИЛ-1 α , ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-8, ИФН γ , ФНО α). Исследование регуляторной активности генов STAT3, GATA3 и MAPK8 у облучённых лиц и в группе сравнения не выявило статистически значимых различий. Вместе с тем, уровни экспрессии гена NF- κ B1 были существенно ниже ($p=0,003$) у облучённых людей относительно группы сравнения, а гена PAD4, напротив, существенно выше ($p=0,05$). По данным корреляционного анализа не было установлено статистически значимой зависимости транскрипционной активности генов NF- κ B1 и PAD4 от величины накопленной дозы облучения ККМ. Интерес также представляла оценка тех показателей системного иммунитета у облучённых людей, которые определяются регуляторной активностью генов NF- κ B1 и PAD4. Для этого в сравниваемых группах методами корреляционного и регрессионного анализа оценивалась зависимость показателей системного иммунитета, характеризующих состояние сигнальных

путей, в которые вовлечены белковые продукты генов NF- κ B1 и PAD4 [2], от уровня экспрессии этих генов. Корреляционный анализ в группе облучённых людей показал отсутствие статистически значимых зависимостей количества CD3⁺, CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺, CD19⁺ лимфоцитов, уровней сывороточных IgM, IgG, IgA и содержания ИЛ-1 α , ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-8, ФНО α и ИФН γ от транскрипционной активности гена NF- κ B1. В группе сравнения регистрировалась умеренная положительная корреляционная зависимость абсолютного количества CD19⁺ лимфоцитов в крови ($R=0,29$; $p=0,05$) от уровня экспрессии гена NF- κ B1. В то же время содержание сывороточных IgG и IgM умеренно отрицательно коррелировало с транскрипционной активностью гена NF- κ B1, коэффициенты корреляции составили, соответственно, $-0,41$ ($p=0,007$) и $-0,33$ ($p=0,04$). Регрессионный анализ подтвердил, что содержание IgG в сыворотке крови лиц группы сравнения находилось в умеренной обратной зависимости от уровня экспрессии гена NF- κ B1. Однако не было установлено статистически значимых регрессионных зависимостей между количеством CD19⁺ лимфоцитов в крови и содержанием сывороточного IgM от уровня экспрессии гена NF- κ B1 у лиц группы сравнения. В группе облучённых лиц отмечена лишь умеренная положительная корреляция между интенсивностью внутриклеточного кислородзависимого метаболизма нейтрофилов по данным индуцированного НСТ-теста ($R=0,35$; $p=0,01$) и уровнем экспрессии гена PAD4 (регрессионный анализ не позволил выявить достоверной зависимости). Для других иммунологических показателей (абсолютное число нейтрофилов, моноцитов в крови, фагоцитарная, лизосомальная активность, спонтанная интенсивность внутриклеточного кислородзависимого метаболизма нейтрофилов и моноцитов, уровни сывороточных ИЛ-1 α , ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-8, ФНО α и ИФН γ) статистически значимых зависимостей от транскрипционной активности гена PAD4 в группе облучённых лиц установлено не было. Так же не было зарегистрировано взаимосвязей между вышеперечисленными иммунологическими показателями и уровнем экспрессии гена PAD4 у лиц группы сравнения.

Результаты настоящего исследования свидетельствовали о том, что хроническое радиационное воздействие с преимущественным облучением ККМ человека может длительно модифицировать транскрипционную активность

иммунорегуляторных генов, таких как NF-κB1 и PAD4 и, как следствие, модулировать иммунные ответы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Шуленина Л. В., Ушенкова Л. Н., Ледин Е. В., Шагирова Ж. М., Раева Н. Ф., Засухина Г. Д., Михайлов В. Ф. Экспрессия генов P53, NPM1, Kras, c-Myc, P14ARF в крови онкологических больных до и после лучевой терапии. Радиационная биология. Радиоэкология. 2012, 52 (6), 572–581. [Shuleniina L. V., Ushenkova L. N., Ledin E. V., Shagirova J. M., Raeva N. F., Zasukhina G. D., Mikhailov V. F. Expression of P53, NPM1, Kras, c-Myc, p14ARF Genes in Blood Cells of Cancer Patients Before and After Radiation Therapy. Radiation Biology. Radioecology. 2012, 52 (6), 572–581].
2. Database of metabolic pathways KEGG PATHWAY Database. 2018. URL: <http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>.

EXPRESSION OF IMMUNE RESPONSE GENES IN CHRONICALLY IRRADIATED PERSONS AT LATE PERIOD AFTER EXPOSURE

© 2019 A. A. Akleyev^{1,3*}, V. S. Nikiforov^{1,2}, E. A. Blinova^{1,2}, I. I. Dolgushin³

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

¹Urals Research Center for Radiation Medicine of the FMBA of Russia, Chelyabinsk, Russia;

²Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russia;

³Southern-Urals State Medical University of the RF Ministry of Public Health, Chelyabinsk, Russia

Received: 25.03.2019. Accepted: 08.04.2019

At late period after exposure a decrease in the level of NF-κB1 gene expression and an increase in the level of PAD4 gene expression were registered in exposed persons. Considering the dependence of some immunity parameters on the levels of NF-κB1 and PAD4 gene expression, it can be assumed that changes in the immunity of exposed persons in the remote period can be mediated by changes in transcriptional activity of genes.

Key words: immunity, radiation, gene expression

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;

Nikiforov V. S., Junior researcher of Molecular-cell Radiobiology Laboratory, Urals Research Center for Radiation Medicine, Chelyabinsk, Russia; Postgraduate student of the Department of Radiation Biology, Chelyabinsk State 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;

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.

СВЯЗЬ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ С НЕКОТОРЫМИ ПОКАЗАТЕЛЯМИ АДАПТИВНОГО ИММУНИТЕТА У ЛИЦ, ПОДВЕРГШИХСЯ ХРОНИЧЕСКОМУ РАДИАЦИОННОМУ ВОЗДЕЙСТВИЮ

© 2019 г. Е. А. Блинова^{1,2}, А. А. Аклеев^{1,3*}, А. И. Котикова¹, М. А. Янишевская²

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

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

²ФГБОУ ВО «Челябинский государственный университет», Челябинск, Россия;

³ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет»
Минздрава России, Челябинск, Россия

Поступила: 25.03.2019. Принята: 10.04.2019

Выявлена связь полиморфных участков rs2239815 гена *MAPK8*, rs1053023 гена *STAT3*, rs4143094 гена *GATA3* и rs28362491 гена *NF-kB1* с абсолютным и относительным количеством CD19⁺ лимфоцитов, абсолютным и относительным числом CD3⁺CD4⁺ лимфоцитов, а также с абсолютным содержанием CD3⁺ и CD3⁺CD8⁺ лимфоцитов в крови у лиц, подвергшихся хроническому радиационному воздействию.

Ключевые слова: адаптивный иммунитет, радиация, однонуклеотидный полиморфизм

DOI: 10.31857/S102872210006478-0

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:

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;

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;

Котикова А. И., старший лаборант лаборатории молекулярно-клеточной радиобиологии ФГБУН «Уральский научно-практический центр радиационной медицины» ФМБА России, Челябинск, Россия;

Янишевская М. А., магистрант кафедры радиационной биологии ФГБОУ ВО «Челябинский государственный университет», Челябинск, Россия.

Ответы иммунной системы на воздействие ионизирующей радиации обнаруживают индивидуальную вариабельность, что может быть обусловлено вариабельностью в экспрессии генов иммунного ответа и определяться генетическим полиморфизмом. Крупномасштабные международные исследования по полногеномному поиску ассоциаций (GWAS) между признаками и генетическими маркерами свидетельствуют об определённом вкладе однонуклеотидных полиморфизмов (ОНП) в формирование того или иного признака, а также об их вкладе в повышение риска развития ряда заболеваний, в том числе онкологических [1]. Находясь в кодирующей части генома, ОНП могут приводить к изменениям структурных и функциональных свойств кодируемого белка, а, располагаясь в некодирующей области (энхансерах, донорах сплайсинга и акцепторных сайтах интронов), приводить к изменению уровня экспрессии генов [2]. Из этого следует, что определённые ОНП могут модифицировать иммунные ответы на радиационное воздействие и тем самым повышать

риск формирования отдалённых последствий облучения. Таким образом, определение роли генетической компоненты в модификации иммунных ответов на радиационное воздействие может способствовать пониманию механизмов формирования отдалённых медицинских эффектов облучения и выявлению ключевых маркеров индивидуальной радиочувствительности человека.

В связи с этим, целью работы являлось установление связи носительства однонуклеотидных полиморфных участков генов *MAPK8*, *STAT3*, *GATA3* и *NF-kB1* с количественными показателями адаптивного иммунитета в отдалённые сроки у лиц, подвергшихся хроническому радиационному воздействию.

Работу проводили на базе ФГБУН «Уральский научно-практический центр радиационной медицины» ФМБА России (г. Челябинск). Исследуемая группа включала 384 облучённых человека (124 мужчины и 260 женщин) – жителей прибрежных сёл реки Течи. Выбор иммунологических показателей, с которыми могут быть ассоциированы полиморфные участки кандидатных генов, проводили на основе анализа молекулярных путей, в которые вовлечены исследуемые гены [3]. Все пациенты, включённые в исследование, подписывали добровольное информированное согласие.

В качестве показателей адаптивного иммунитета методом CD-типирования в крови оценивали абсолютное и относительное количество лимфоцитов с фенотипами: CD3⁺, CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺, CD19⁺, рассчитывали иммунорегуляторный индекс (CD4⁺/CD8⁺). Для этих целей использовали стандартную панель моноклональных антител (Beckman Coulter, США). Анализ численности субпопуляций лимфоцитов проводили на проточном цитометре Navios (Beckman Coulter, США). Генотипирование образцов проводили по четырём полиморфным участкам генов: *MAPK8* rs2239815, *STAT3* rs1053023, *GATA3* rs4143094 и *NF-kB1* rs28362491. Для генотипирования использовали ДНК, выделенную из замороженных при –80 °С образцов крови. Детекцию результатов осуществляли методом полимеразной цепной реакции в реальном времени на приборе «Applied Biosystems Step One Plus» (США) с использованием наборов реагентов «ФЛЭШ» (ТестГен, Россия).

Оценка связи полиморфного участка rs2239815 гена *MAPK8* с количеством иммунокомпетентных клеток у лиц, подвергшихся хроническому

радиационному воздействию, позволила выявить более высокие показатели абсолютного ($p=0,04$) и относительного ($p=0,02$) количества CD19⁺ лимфоцитов у носителей минорного аллеля С. Согласно рецессивной модели у носителей минорного гомозиготного генотипа С/С абсолютное количество CD19⁺ лимфоцитов было ниже по сравнению с носителями гомозиготного генотипа Т/Т и гетерозиготного генотипа Т/С ($p=0,04$). В соответствии с доминантной моделью, для носителей минорного аллеля С (генотипы Т/С и С/С) относительное количество CD19⁺ лимфоцитов также было ниже относительно носителей генотипа Т/Т ($p=0,02$). Исследование связи полиморфного участка rs1053023 гена *STAT3* с показателями адаптивного иммунитета позволило выявить статистически значимые связи с количеством CD3⁺ и CD3⁺CD4⁺ лимфоцитов. Согласно рецессивной модели у носителей минорного генотипа С/С наблюдалось более высокое содержание CD3⁺ ($p=0,02$) и CD3⁺CD4⁺ лимфоцитов в крови ($p=0,04$) по сравнению с носителями генотипов Т/Т и Т/С. Также регистрировалась связь носительства полиморфного участка rs4143094 гена *GATA3* с количеством CD3⁺ и CD3⁺CD8⁺ лимфоцитов в крови. У носителей гомозиготного генотипа С/С наблюдалось более высокое абсолютное содержание CD3⁺ лимфоцитов ($p=0,009$) и CD3⁺CD8⁺ лимфоцитов ($p=0,007$) в крови по сравнению с носителями аллеля А (генотипы А/А и А/С). У лиц, не имеющих делеции в регуляторном участке rs28362491 гена *NF-kB1*, наблюдалось сниженное относительное количество CD3⁺CD4⁺ лимфоцитов ($p=0,02$) в крови по сравнению с лицами, имеющими делецию (генотипы Ins/Del и Del/Del).

Белковые продукты генов *MAPK8*, *STAT3*, *GATA3* и *NF-kB1* являются транскрипционными факторами и непосредственно регулируют процессы пролиферации, созревания и дифференцировки CD3⁺ и CD19⁺ лимфоцитов. Таким образом, можно сделать заключение, что исследуемые полиморфные участки rs2239815 (*MAPK8*), rs28362491 (*NF-kB1*), rs1053023 (*STAT3*), rs4143094 (*GATA3*) влияют на количественные показатели CD3⁺, CD4⁺ и CD19⁺ лимфоцитов. Однако, чтобы сделать однозначный вывод о роли генетической компоненты в модификации иммунных ответов у облучённых лиц, необходимо минимизировать влияние фактора дозы облучения ККМ путём увеличения группы облучённых лиц.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. *Visscher P. M., Brown M. A., McCarthy M. I., Yang J.* Five years of GWAS discovery. *Am J. Hum. Genet.* 2012, 13, 90 (1), 7–24.
2. Подколотный Н. Л., Афонников Д. А., Васькин Ю. Ю., Брызгалов Л. О., Иванисенко В. А., Деменков П. С., Пономаренко М. П., Рассказов Д. А., Гунбин К. В., Процук И. В., Шутков И. Ю., Леонтьев П. Н., Фурсов М. Ю., Бондарь Н. П., Антонцева Е. В., Меркулова Т. И., Колчанов Н. А. Программный комплекс SNP-MED для анализа влияния однонуклеотидных полиморфизмов на функцию генов, связанных с развитием социально значимых заболеваний. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2013, 17, 4/1, 577–588. [*Podkolodnyy N. L., Afonnikov D. A., Vaskin Yu. Yu., Bryzgalov L. O., Ivanisenko V. A., Demenkov P. S., Ponomarenko M. P., Rasskazov D. A., Gunbin K. V., Protsyuk I. V., Shutov I. Yu., Leontyev P. N., Fursov M. Yu., Bondar N. P., Antontseva E. V., Merkulova T. I., Kolchanov N. A.* The SNP-MED system for analysis of the effect of single-nucleotide polymorphisms on the function of genes associated with socially significant diseases. *Vavilovskii zhurnal genetiki i seleksii.* 2013, 17, 4/1, 577–588]
3. Database of metabolic pathways KEGG PATHWAY Database. 2018. URL: <http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>.

ASSOCIATION OF GENE POLYMORPHISMS WITH SOME INDICATORS OF ADAPTIVE IMMUNITY IN CHRONICALLY EXPOSED PERSONS

© 2019 Е. А. Blinova^{1,2}, А. А. Akleyev^{1,3*}, А. И. Kotikova¹,
М. А. Yanishevskaya²

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

¹Urals Research Center for Radiation Medicine of the FMBA of Russia, Chelyabinsk, Russia;

²Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russia;

³Southern-Urals State Medical University of the RF Ministry of Public Health, Chelyabinsk, Russia

Received: 25.03.2019. Accepted: 10.04.2019

Associations between polymorphic sites rs2239815 of gene *MAPK8*, rs1053023 of gene *STAT3*, rs4143094 of gene *GATA3*, rs28362491 of gene *NF-kB1* with the absolute and relative number of CD19⁺ lymphocytes, CD3⁺CD4⁺ lymphocytes and with the absolute content of CD3⁺ and CD3⁺CD8⁺ lymphocytes were registered in exposed persons.

Key words: adaptive immunity, radiation, single nucleotide polymorphism

Authors:

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;

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;

Kotikova A. I., senior laboratory assistant of Molecular-cell Radiobiology Laboratory, Urals Research Center for Radiation Medicine, Chelyabinsk, Russia;

Yanishevskaya M. A., undergraduate of the Department of Radiation Biology, Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russia.

ИЗМЕНЕНИЕ ГЕМОГЛОБИНОВОГО ПРОФИЛЯ КОСТНОГО МОЗГА И ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ КРЫС В УСЛОВИЯХ ОСТРОГО АСЕПТИЧЕСКОГО ВОСПАЛЕНИЯ

©2019 г. С. А. Бриллиант^{1,2*}, Б. Г. Юшков^{1,2}, Н. В. Тюменцева^{1,2}

*E-mail: svetlana.brilliant@bk.ru

¹ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии УрО РАН», Екатеринбург, Россия;

²ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий», Екатеринбург, Россия

Поступила: 04.03.2019. Принята: 21.03.2019

В данной статье представлена оценка гемоглобинового профиля костного мозга и периферической крови крыс в условиях острого асептического воспаления. Произведена количественная оценка эритроидных клеток при развитии воспаления.

Ключевые слова: воспаление, гемоглобин, костный мозг, кровь

DOI: 10.31857/S102872210006477-9

Адрес: 620049 г. Екатеринбург, ул. Первомайская, 106, ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии УрО РАН», лаборатория иммунофизиологии и иммунофармакологии, Бриллиант Светлана Александровна.
Тел.: +79122070984, 8(343)3740070.

E-mail: svetlana.brilliant@bk.ru

Авторы:

Бриллиант С. А., м.н.с. лаборатории иммунофизиологии и иммунофармакологии ИИФ УрО РАН, Екатеринбург, Россия; н.с. центральной экспериментальной лаборатории биотехнологий ГАУЗ СО ИМКТ, Екатеринбург, Россия;

Юшков Б. Г., д.м.н., профессор, г.н.с. лаборатории иммунофизиологии и иммунофармакологии ИИФ УрО РАН, Екатеринбург, Россия; г.н.с. центральной экспериментальной лаборатории биотехнологий ГАУЗ СО ИМКТ, Екатеринбург, Россия;

Тюменцева Н. В., к.б.н., с.н.с. лаборатории иммунофизиологии и иммунофармакологии ИИФ УрО РАН, Екатеринбург, Россия; в.н.с. центральной экспериментальной лаборатории биотехнологий ГАУЗ СО ИМКТ, Екатеринбург, Россия.

Гемопоэтические клетки отличаются большим разнообразием структуры и функции, обеспечивающим в процессе их созревания самые различные биологические процессы, такие, как: транспорт кислорода, гемостаз, фагоцитоз, иммунитет. Чрезвычайно важная роль в регуляции гомеостаза периферической крови отводится органам кроветворения, в частности, костному мозгу, где в условиях нормы имеют место сохранение динамического равновесия между процессами гемопоэза и распада клеток, а также

определенная стадийность дифференцировки элементов миелоидного, лимфоидного, эритроцитарного и мегакариоцитарного рядов [1]. Исследователи из группы Токушева А. Н. показали, что развитие асептического воспаления в крови у опытных крыс вызывает транзиторное уменьшение лейкоцитарного пула и эритроцитов на 1 сут после введения скипидара. На 7 сут исследования наблюдалось восстановление красной крови, повышение лейкоцитарного пула за счет лимфоцитов, моноцитов и нейтрофилов, что соответствовало разворачивающейся картине асептического воспаления [2]. Однако влияние острого асептического воспаления на изменение параметров всей системы эритрона на данный момент остается мало изученным.

Целью данной работы являлось изучение изменения гемоглобинового профиля костного мозга и периферической крови крыс в условиях острого асептического воспаления.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводили на 30 крысах линии Wistar массой 250–300 г в соответствии с принципами Директивы 2010/63/EUЕС. Острое локальное воспаление вызывали путем введения под кожу спины скипидара в количестве 0,5 мл под эфирным наркозом. Экспериментальных животных делили на 3 группы. Первая группа

служила контролем. Забор материала у крыс 2-й и 3-ей групп осуществляли спустя 6 ч и 2 сут после ведения скипидара. Животных выводили из эксперимента путем передозировки диэтилового эфира. Проводили оценку следующих показателей: миелограмма, общий анализ крови, содержание ретикулоцитов и содержание эритроцитов с фетальными формами гемоглобина, соотношения белковых фракций гемоглобина костного мозга и периферической крови. Статистическую обработку данных осуществляли с применением непараметрических методов статистики («Statistica 8.0»). Сравнение групп выполняли с использованием критерия Манна-Уитни. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Анализ миелограммы выявил, что через 6 ч после острого асептического воспаления отмечается увеличение общего числа эритробластов, миелобластов, миелоцитов, ретикулярных клеток и мегакариоцитов. Возрастание числа эритробластов с увеличением числа ретикулярных клеток свидетельствует об активации эритропоэза. Однако, уже на 2 сут, число эритробластов и миелоцитов значительно снижается по сравнению с контрольной группой. Как известно, миелобласты являются клетками-предшественницами гранулоцитов, которые в свою очередь являются неотъемлемыми участниками воспалительного процесса. Образуясь в костном мозге, эти белые клетки крови, мигрируют в очаг воспаления, и уже на 2 сут после экспериментального воздействия их число вновь приближается к значению контрольных животных.

Изменения, происходящие в кроветворной ткани и в системном кровотоке при остром асептическом воспалении, в большей степени связаны с клетками гранулоцитарного ростка гемопоэза. Со стороны белой крови отмечается типичная картина развития нейтрофильного лейкоцитоза. Со стороны красной крови впервые 6 ч после введения скипидара существенных изменений не наблюдается. На 2 сут уменьшается общее содержание гемоглобина и число эритроцитов. Отмечается ретикулоцитоз, что указывает на усиление эритропоэза. Количество эритроцитов, несущих фетальные формы гемоглобина на протяжении всего эксперимента достоверно не изменяется.

В костном мозге на раннем сроке после введения скипидара наблюдается снижение доли

гемоглибинов 1 и 2 белковых фракций, за счёт увеличения содержания гемоглибинов 3 и 6. На 2 сут после проведения эксперимента уровень 4, 5 и 6 белковых фракций гемоглибина возрастает за счет снижения гемоглибина 1, 2 и 3 белковых фракций. Изменения гемоглибинового профиля периферической крови обусловлены снижением содержания 1, 2 и 3 изоформ за счет увеличения количества гемоглибина 5 и 6 белковых фракций. По предположению, выдвинутому Стародубом Н. Ф. [3], фракции 5 и 6 гемоглибина крыс являются физиологическим эквивалентом фетального гемоглибина человека, тем самым благодаря данным фракциям обеспечивается перенос большего количества кислорода к месту воспаления. На 2 сут после введения скипидара у крыс повышается содержание гемоглибина 4 и 6 фракций за счёт уменьшения содержания гемоглибина 1 и 2 изоформ.

ВЫВОДЫ

Таким образом, при остром асептическом воспалении наблюдаются изменения в системе эритрона. Со стороны клеток гранулоцитарного ростка выражающиеся в нейтрофильном лейкоцитозе. Со стороны клеток эритроидного ряда отмечается увеличение количества ретикулоцитов и эритробластов, свидетельствующие об активации эритропоэза. При введении скипидара на раннем сроке наблюдаются выраженные изменения гемоглибинового профиля костного мозга. На позднем сроке увеличение отдельных белковых фракций свидетельствует о наработке молодых клеток в костном мозге с последующим их выходом в кровоток. В периферической крови отмечается изменение белковых фракций, что указывает на усиление компенсаторных механизмов в ответ на развитие воспалительной реакции в организме.

Работа выполнена в рамках государственного задания ИИФ УрО РАН (тема № АААА- А18-118020590108-7).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Острая массивная кровопотеря /под ред. А. И. Воробьева, В. М. Городецкого, Москва: ГОЭТАР-МЕД.2001, С. 5–11. [Acute massive blood loss, ed. by A. I. Vorobyev, V. M. Gorodetsky, Moscow: GOATER-MED.2001, pp. 5–11.]
2. Реакция периферической крови крыс в ответ на воспаление, вызванное на фоне интоксикации соединениями ванадия и хрома / А. Н. Токушева, М. К. Балабекова, С. Е. Мырзагулова // Со-

- временные проблемы науки и образования, № 6. 2015, с. 273. [Peripheral blood reaction of rats in response to inflammation caused by intoxication with vanadium and chromium compounds / A. N. Tokusheva, M. K. Balabekova, S. E. Myrzagulova // Modern problems of science and education, № 6. 2015, p. 273.]
3. Стародуб Н. Ф. Гетерогенная система гемоглобина: структура, свойства, синтез, биологическая роль / Н. Ф. Стародуб, В. И. Назаренко. Киев: Наук. Думка. 1987, 200 с. [Starodub N. F. Heterogeneous system of hemoglobin: structure, properties, synthesis, biological role / N. F. Starodub, V. I. Nazarenko. Kiev: Sciences. Dumka. 1987, 200 p.]

MODIFICATION HEMOGLOBIN PROFILE THE BONE MARROW AND PERIPHERAL BLOOD AT RATS IN CONDITIONS OF ACUTE ASEPTIC INFLAMMATION

© 2019 S. A. Brilliant^{1,2*}, B. G. Yushkov^{1,2}, N. V. Tyumentseva^{1,2}

*E-mail: svetlana.brilliant@bk.ru

¹«Institute of Immunology and Physiology», Ural Branch of Russian Academy Sciences, Yekaterinburg, Russia;

²GAUZ SB «Institute of Medical Cellular Technologies», Yekaterinburg, Russia

Received: 04.03.2019. Accepted: 21.03.2019

This article presents an assessment of hemoglobin profile the bone marrow and peripheral blood at rats in conditions acute aseptic inflammation. The produced a quantitative assessment the erythroid cells with the development of inflammation.

Key words: inflammation, hemoglobin, bone marrow, blood

Autors:

Brilliant S. A., ✉ junior researcher Institute of immunology and physiology of URO RAS, Yekaterinburg, Russia; research science GAUZ SR Institute of medical cellular technologies, Yekaterinburg, Russia. E-mail: svetlana.brilliant@bk.ru;

Yshkov B. G., Doctor of medical science, professor, Head of the laboratory of immunophysiology and immunopharmacology Institute of immunology and physiology of URO RAS, Yekaterinburg, Russia; Chief researcher GAUZ SR Institute of medical cellular technologies, Yekaterinburg, Russia;

Tyumentseva N. V., PhD, senior researcher Institute of immunology and physiology of URO RAS, Yekaterinburg, Russia; leading researcher GAUZ SR Institute of medical cellular technologies, Yekaterinburg, Russia.

ИММУННАЯ РЕАКТИВНОСТЬ ПРИ ТОКСИЧЕСКОМ ПОРАЖЕНИИ ПЕЧЕНИ АЛКОГОЛЬНОЙ ЭТИОЛОГИИ

© 2019 г. Н. А. Конопля*, С. А. Долгарева, А. В. Сорокин,
Г. Н. Рыжикова

*E-mail: konoplya_nikolay@rambler.ru

ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет»
Минздрава России, Курск, Россия

Поступила: 15.02.2019. Принята: 28.02.2019

На 62 крысах Вистар с 30-дневным, в большей степени с 60-дневным введением этанола, установлено биохимическими и морфологическими методами развитие токсического поражения печени. На фоне 60-дневной хронической алкогольной интоксикации, по сравнению с 30-дневным введением этанола, установлена более выраженная супрессия формирования адаптивной клеточной и гуморальной форм иммунного ответа на эритроциты барана, снижение фагоцитарных возможностей нейтрофилов при повышении их кислород-зависимой активности.

Ключевые слова: токсическое поражение печени, этанол, нарушения иммунитета

DOI: 10.31857/S102872210006476-8

Адрес: 305041 Курск, ул. Карла Маркса, д.3; ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» Минздрава России, кафедра оториноларингологии, Конопля Николай Александрович. Тел.: +7910 730 99 28 (моб.).

E-mail: konoplya_nikolay@rambler.ru

Авторы:

Конопля Н. А., д.м.н., профессор кафедры оториноларингологии ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» Минздрава России, Курск, Россия;

Долгарева С. А., д.м.н., профессор кафедры биологической химии ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» Минздрава России, Курск, Россия;

Сорокин А. В., заочный аспирант кафедры биологической химии ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» Минздрава России, Курск, Россия;

Рыжикова Г. Н., к.б.н., старший преподаватель кафедры биологической химии ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» Минздрава России, Курск, Россия.

Хроническое злоупотребление алкоголем и связанная с этим патология является одной из важных медико-социальных проблем. Наиболее чувствительны к действию алкоголя, который является одним из ведущих в этиологической структуре патологии панкреатобилиарной системы, печень и поджелудочная железа [1, 2]. В то же время малочисленны исследования, зачастую и противоречивы, в том числе экспериментальные, касающиеся иммунных на фоне кратковременной и длительной алкогольной

интоксикации [3, 4]. В соответствии с этим, **целью исследований** стала оценка изменений в печени, адаптивного иммунитета, функционально-метаболической активности нейтрофилов периферической на фоне экспериментальной хронической алкогольной интоксикации.

ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ МЕТОДЫ

Исследования проведены на 62 здоровых половозрелых крысах Вистар с соблюдением принципов, изложенных в Конвенции по защите позвоночных животных (г. Страсбург, Франция, 1986). Токсической поражение печени (ТПП) моделировали 30- и 60-кратным, через 24 часа, внутрижелудочным введением 20% раствора этанола (2 мл/кг). Экспериментальных животных делили на две части в зависимости от воздействия этанола: 30 или 60 дней. Соответственно на 25 или 55 день проводили иммунизацию или сенсibilизацию эритроцитами барана (ЭБ). Забой крыс осуществляли через 24 часа после последнего введения этанола. Группа контроля состояли из 15 здоровых животных. Клеточную форму адаптивного иммунного ответа оценивали по степени развития реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) к ЭБ. ГЗТ воспроизводили путем внутрибрюшинного введения ЭБ: сенсibilизирующей (10^8 клеток) и на

четвертые сутки разрешающей дозы (10^6 клеток). О выраженности ГЗТ судили через сутки после введения разрешающей дозы ЭБ по разнице масс регионарного и контралатерального лимфатических узлов (РМ) и по разнице количества в них кариоцитов (РК). Гуморальный иммунный ответ (ГИО) индуцировали однократным внутрибрюшинным введением ЭБ в дозе 2×10^9 клеток на 1 кг массы тела. Степень развития ГИО на ЭБ оценивали на 5-е сутки после иммунизации по числу иммунных антителообразующих клеток (АОК) в селезенке. Фагоцитарная активность нейтрофилов периферической крови оценивалась по фагоцитарному показателю (ФП), фагоцитарному числу (ФЧ) и индексу активности фагоцитоза (ИАФ), а кислород-зависимая – по НСТ-тестам спонтанному (НСТ-сп.) и стимулированному опсонизированным и неопсонизированным зимозаном (НСТ-ст. н/з, НСТ-ст. о/з), коэффициентам опсонизации, активации на опсонизированный и неопсонизированный зимозан (КО, КАН, КАО). Для оценки функционального состояния печени в плазме крови определяли активность аспартат- и аланинаминотрансфераз (АСТ, АЛТ), щелочной фосфатазы (ЩФ), гаммаглутаминтранспептидазы (ГГТ), содержание билирубина, фибриногена и протромбиновый индекс (ПТИ). Величины всех перечисленных показателей определяли унифицированными методами с использованием стандартных наборов реактивов. После выведения животных из эксперимента морфологическому анализу подвергались биоптаты печени. Статистическую обработку результатов исследования проводили путем вычисления медианы (Me) и 25 и 75 перцентилей с помощью пакета компьютерной программы Statistica 8. Существенность различий оценивали по U-критерию Манна-Уитни. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

После введения этанола в течение 30 дней, в большей степени при 60-дневной интоксикации, у крыс наблюдалось повышение активности АЛТ и АСТ (развитие цитолитического синдрома), содержания билирубина, активности ГГТ (наличие внутриклеточного холестаза), снижение коэффициента де Ритиса ниже 1 (токсическое поражение печени по воспалительному типу), снижение уровня фибриногена (синдром недостаточности синтетических процессов) и активации свертывающей системы

крови (повышение ПТИ). Развитие ТПП подтверждено морфологически. ТПП, развивающаяся на фоне 30-дневной, в большей степени при более длительной интоксикации этанолом, приводило к супрессии формирования адоптивной клеточной и гуморальной форм иммунного ответа, о чем свидетельствовало снижение иммунных АОК в селезенке и РМ и РК. Установлено также угнетение фагоцитарной (ФП, ФЧ, ИАФ) и стимуляция параметров кислородзависимой активности нейтрофилов периферической крови (НСТ-сп. и НСТ-ст. н/з). При этом уровень НСТ-ст. о/зи резервы кислородзависимой активности фагоцитов (КАО, КАН и КО) в этих группах не отличался от показателей контроля.

Таким образом, можно утверждать, что при токсическом поражении печени алкогольной этиологии угнетается гуморальная и клеточная формы иммунного ответа и фагоцитарная активность нейтрофилов циркулирующей крови с одновременной активацией их кислородзависимой активности, что требует применения при данной патологии методов коррекции иммунного статуса.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Белова Ю. Ю. Алкоголизация населения как угроза национальной безопасности России: социальные последствия и их влияние на реализацию национальных интересов Российской Федерации. Вестник экономики, права и социологии. 2012, 1, 278–282. [Belova Yu. Yu. Alkogolizaciya naseleniya kak ugroza nacional'noj bez-opasnosti Rossii: social'nye posledstviya i ih vliyanie na realizaciyu nacional'nyh interesov Rossijskoj Federacii. Vestnik ehkonomiki, prava i sociologii. 2012, 1, 278–282.]
2. Винник Ю. С., Дунаевская С. С., Антюфриева Д. А. Риск развития осложненной при остром алкоголе-ассоциированном панкреатите. Новости хирургии 2012, 20(4), 38–41. [Vinnik YU. S., Dunaevskaya S. S., Antyufrieva D. A. Risk razvitiya oslozhnenij pri ostrom alkogol'-associirovannom pankreatite. Novostihirurgii 2012, 20 (4), 38–41.]
3. Бровкина И. Л., Быстрова Н. А., Гаврилюк В. П., Павлова М. В. Иммунометаболические нарушения в условиях экспериментальной этанольной интоксикации. Вестн. новых мед. технол. 2007, 15(2), 9–11. [Brovkina I. L., Bystrova N. A., Gavriilyuk V. P., Pavlova M. V. Immune and metabolic infringements at an experimental poisoning with ethanol. Vestn. novyh. med. tekhnol. 2007, 14 (2), 9–11.]
4. Конопля А. И., Локтионов А. Л., Дудка В. В., Долгарева С. А., Сорокин А. В., Бушмина О. Н. Хроническая интоксикация этанолом: метаболические изменения, коррекция нарушений. Токсикологический вестник 2015, 5, 25–30. [Konoplya A. I., Lok-

tionov A. L., Dudka V. V., Dolgareva S. A., Sorokin A. V.,
Bushmina O. N. Hronicheskaya intoksikaciya ehtano-

lom: metabolicheskie izmeneniya, korrekciya narush-
enij. Toksikologicheskij vestnik 2015, 5, 25–30.]

IMMUNE REACTIVITY IN TOXIC LIVER DAMAGE OF ALCOHOL ETIOLOGY

© 2019 N. A. Konoplya*, S. A. Dolgareva, A. V. Sorokin,
G. N. Ryzhikova

*E-mail: konoplya_nikolay@rambler.ru
Kursk State Medical University, Kursk, Russia

Received: 15.02.2019. Accepted: 28.02.2019

On 62 Wistar rats with a 30-day-long, to a greater extent with a 60-day-long ethanol introduction, the development of toxic liver damage has been established by biochemical and morphological methods. In presence of a 60-day-long chronic alcohol intoxication, compared with a 30-day-long ethanol introduction, a more pronounced suppression of adaptive cellular and humoral forms formation of the immune response to sheep erythrocytes, a decrease in the phagocytic capabilities of neutrophils with an increase in their oxygen-dependent activity have been determined.

Key words: toxic liver damage, ethanol, dysimmunity

Authors:

Konoplya N. A., ✉ ScD in Medicine, Professor, the Otorhinolaryngology Department, Kursk State Medical University, Kursk, Russia. E-mail: konoplya_nikolay@rambler.ru;

Dolgareva S. A., ScD in Medicine, Professor, the Biological Chemistry Department, Kursk State Medical University, Kursk, Russia;

Sorokin A. V., Post-graduate student at the Biological Chemistry Department, Kursk State Medical University, Kursk, Russia;

Ryzhikova G. N., PhD in Biology, Senior Lecturer, the Biological Chemistry Department, Kursk State Medical University, Kursk, Russia.

МАРКЕРЫ ВОСПАЛЕНИЯ И ОКСИДАТИВНОГО СТРЕССА ПРИ ЛЕЧЕНИИ ОСТРОЙ ИШЕМИИ НИЖНИХ КОНЕЧНОСТЕЙ

© 2019 г. И. Д. Магамедов, Л. П. Пивоварова, О. Б. Арискина*,
С. П. Нохрин, В. В. Сорока

*E-mail: olga.ariskina@mail.ru

ГБУ СПб НИИ скорой помощи им. И. И. Джанелидзе, Санкт-Петербург, Россия

Поступила: 12.03.2019. Принята: 25.03.2019

Острая ишемия возникает из-за препятствия кровообращения, вызывая оксидативный стресс и деструкцию ткани. Восстановление кровотока – реперфузионный синдром – тканевые антигены устремляются в кровоток, усиливая продукцию АФК и стимулируя воспаление. Цель работы – определение взаимосвязи окислительного стресса, воспаления с тяжестью и исходом заболевания. Наблюдали 44 больных с острой ишемией нижних конечностей и базисной терапией. Изучали изменение в процессе лечения оксидантной активности крови по уровню хемилуминесценции, общей антиоксидантной активности плазмы, уровня С-реактивного белка как маркера воспаления и креатинкиназы, отражающей повреждение ткани, количества лейкоцитов в крови с подсчетом лейкограммы и нейтрофильно-лимфоцитарного и тромбоцито-лимфоцитарного коэффициентов. Острая ишемия нижних конечностей сопровождается деструкцией тканей и повышением продукции АФК, снижением общей антиоксидантной активности, усилением системного воспаления в период реперфузии. С ростом тяжести заболевания наблюдается усиление окислительного стресса, который усугубляет деструкцию тканей и провоцирует дальнейший рост системного воспалительного ответа.

Ключевые слова: острая ишемия конечности, оксидантная и антиоксидантная активность, маркеры воспаления

DOI: 10.31857/S102872210006475-7

Адрес: 192242, Санкт-Петербург, ул. Будапештская, д. 3, ГБУ СПб НИИ скорой помощи им. И. И. Джанелидзе, отдел лабораторной диагностики, Арискина Ольга Борисовна. Тел./факс: 8(812) 3844668, 89119331926 (моб.).

E-mail: olga.ariskina@mail.ru

Авторы:

Магамедов И. Д., хирург отделения сосудистой хирургии ГБУ СПб НИИ скорой помощи им. И. И. Джанелидзе, Санкт-Петербург, Россия;

Пивоварова Л. П., д. м. н., заведующая отделом лабораторной диагностики ГБУ СПб НИИ скорой помощи им. И. И. Джанелидзе, Санкт-Петербург, Россия;

Арискина О. Б., к. б. н., н. с. отдела лабораторной диагностики ГБУ СПб НИИ скорой помощи им. И. И. Джанелидзе, Санкт-Петербург, Россия;

Нохрин С. П., д. м. н., с. н. с. отдела сосудистой хирургии ГБУ СПб НИИ скорой помощи им. И. И. Джанелидзе, Санкт-Петербург, Россия;

Сорока В. В., д. м. н., заведующий отделением сосудистой хирургии ГБУ СПб НИИ скорой помощи им. И. И. Джанелидзе, Санкт-Петербург, Россия.

ВВЕДЕНИЕ

Острая ишемия нижних конечностей (ОИНК) представляет собой одну из самых сложных про-

блем сосудистой хирургии, часто является проявлением более тяжелой патологии (острый инфаркт миокарда, онкологический процесс) и нередко причиной летального исхода. Острая ишемия – это резкое ухудшение или полное прекращение всех трёх основных функций локального кровообращения, а именно доставки в ткань кислорода, удаления из ткани продуктов тканевого метаболизма и субстратов окисления [1].

- В отличие от многих других сосудистых состояний нет определенного лечения;
- Частота летальных исходов при острой ишемии составляет 11–39% [2], послеоперационная летальность 15–20% [3];
- Частота встречаемости 140/миллион/год в России.

Причины развития острой ишемии конечностей:

- Острые тромбозы (40%);
- Эмболии (37%);
- Тромбозы протезов и зон эндоваскулярных вмешательств (до 15%);

• Тромбозы аневризм периферических артерий и травм артерий.

Цель исследования — определить взаимосвязь тяжести острой ишемии конечностей и исхода заболевания с оксидантной и антиоксидантной активностью крови и активностью воспаления.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Обследовано 44 больных с ОИНК и базисной терапией, возраст 73 (61; 83) лет, из них 23 мужчины и 21 женщины. По данным историй болезни пациенты имели следующие сопутствующие заболевания: хроническая анемия — 7%, сахарный диабет — 11%, нарушения мозгового кровообращения — 41%, в том числе ОНМК — 9%, патология сердечно-сосудистой системы — 100%, заболевания бронхо-лёгочной системы — 48%, в том числе ХОБЛ — 7%, ТЭЛА — 2%, застойные явления в малом круге кровообращения — 14%, гипертоническая болезнь 3 ст. — 34%, рецидивы ОИНК — 30%. Больные получали терапию в соответствии с национальными рекомендациями по лечению ОИНК (2013 г.). При поступлении в отделение сосудистой хирургии (до операции), на 1, 3, 5, 7 и 10 сутки после операции исследовали: оксидантную активность крови по уровню хемилюминесценции (ХЛ), общую антиоксидантную активность (ОАА) плазмы [4]. Тогда же определяли уровень С-реактивного белка (СРБ) и креатинкиназы (КК), количество лейкоцитов в крови с подсчетом лейкограммы и нейтрофильно-лимфоцитарного [5] коэффициента (НЛК) как маркера исхода заболевания. Больным присвоили индекс тяжести (ИТ) состояния, включающий характер поражений, объём необходимого вмешательства, развитие осложнений и исход заболевания. Согласно объёму необходимого вмешательства, данных физикального и УЗИ исследований больных, по результатам контрастной ангиографии разделили на группы. Каждому больному присвоили базисный балл, соответствующий принадлежности к конкретной группе: компенсированная ишемия, восстановление кровотока (выписка — 1 балл, летальный исход — 10 баллов), некомпенсированная ишемия, восстановление кровотока (выписка — 3 балла, летальный исход — 10 баллов), необратимая ишемия, ампутация (выписка — 5 баллов, летальный исход — 10 баллов). К этому баллу при возникновении осложнений добавляли дополнительные баллы: инфекционные осложнения — 1 балл, рецидивы тромбозов — 1 балл, гангрена — 2 балла, сепсис — 3 балла.

РЕЗУЛЬТАТЫ

У всех пациентов наблюдали развитие системного воспаления. Лейкоцитоз, повышение КК и СРБ у выживших сохранялись до 3 суток, нейтрофилёз — до 5 суток, лимфоцитопения преодолевалась к этому сроку; у умерших эти нарушения не купировались до 10 суток, а СРБ к 3–5 суткам возрастал, превышая норму в 50 и 60 раз соответственно. Выявлены корреляции между исходом и числом лейкоцитов ($r = -0.48, p < 0.01$), и числом нейтрофилов ($r = -0.53, p < 0.01$), исходом и НЛК ($r = 0.36, p < 0.05$); КК и числом лейкоцитов ($r = 0.37, p < 0.05$), и нейтрофилов ($r = 0.38, p < 0.05$), КК и СРБ ($r = 0.39, p < 0.05$). ИТ коррелировал с уровнем СРБ ($r = 0.45, p < 0.01$), числом нейтрофилов ($r = 0.44, p < 0.01$) и лейкоцитов ($r = 0.37, p < 0.05$), НЛК ($r = 0.45, p < 0.01$). ХЛ крови у всех больных до операции превышала норму в 1,5 раза, возрастая до 5 суток. ОАА умерших при поступлении не отличалась от нормы, снижалась в 1,5–2 раза в период реперфузии; у выживших этот показатель был компенсирован.

Развитие ОИНК сочетается с целым рядом сопутствующих заболеваний. У больных встречались: хроническая анемия — 3%, сахарный диабет 2 типа — 11%, хронические заболевания ЦНС — 41%, ОНМК в анамнезе — 9%, патология ССС — 100%, заболевания бронхо-лёгочной системы — 48%, ХОБЛ — 7%, ТЭЛА — 2%, ГБ 3 ст. — 34%. В процессе лечения у больных возникли осложнения: нагноение ран — 5%, острый пиелонефрит — 48%, инфаркт миокарда — 5%, гангрена — 16%, пневмония — 2%, сепсис — 14%.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

ОИНК сопровождается деструкцией тканей и повышением продукции АФК, снижением ОАА, усилением системного воспаления в период реперфузии. С ростом тяжести заболевания наблюдается усиление окислительного стресса, который усугубляет деструкцию тканей и провоцирует дальнейший рост системного воспалительного ответа. Критериями выздоровления является нормализация ХЛ, ОАА, СРБ и КК.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. *Биленко М. В.* Ишемические и реперфузионные поражения органов. — М: Медицина. 1989. 367 с.
2. *Rutherford's Vascular Surgery and Endovascular Therapy // 9th Edition, June 19, 2018, 2832 p.*
3. Национальные рекомендации по ведению пациентов с заболеваниями артерий нижних конечностей. Российский согласительный документ. — М.:—2013.—67 с.

4. Арутюнян А. В., Дубинина Е. Е., Зыбина Н. Н. Методы оценки свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы организма. Методические рекомендации. – СПб., 2000. – 103 с.
5. Tasoglu I., CiCek O. F., Lafci G. Usefulness of neutrophil/lymphocyte ratio as a predictor of amputation after embolectomy for acute limb ischemia. // Ann. Vasc. Surg. 2014. Vol.28(3). P. 606–613.

MARKERS OF INFLAMMATION AND OXIDATIVE STRESS IN THE TREATMENT OF ACUTE ISCHEMIA OF THE LOWER LIMBS

© 2019 I. D. Magamedov, L. P. Pivovarova, O. B. Ariskina*,
S. P. Nohrin, V. V. Soroka

*E-mail: olga.ariskina@mail.ru

Saint-Petersburg I. I. Dzhanelidze research institute of emergency medicine,
Saint-Petersburg, Russia

Received: 12.03.2019. Accepted: 25.03.2019

Acute ischemia occurs due to obstruction of blood circulation, causing oxidative stress and tissue destruction. Restoration of blood flow – reperfusion syndrome – tissue antigens rush into the bloodstream, increasing the production of ROS and stimulating inflammation. The purpose of the work is to determine the relationship of oxidative stress, inflammation with the severity and outcome of the disease. 44 patients with acute ischemia of the lower limbs and basic therapy were observed. Studied the change in the process of treating blood oxidative activity by the level of chemiluminescence, total antioxidant activity plasma, C-reactive protein level as a marker of inflammation and creatine kinase, reflecting tissue damage, white blood cell count with leukogram count and neutrophilic lymphocyte ratio. Acute ischemia of the lower limbs is accompanied by destruction of tissues and an increase in ROS production, a decrease in total antioxidant activity, and an increase in systemic inflammation during the reperfusion period. With an increase in the severity of the disease, an increase in oxidative stress is observed, which exacerbates the destruction of tissues and provokes a further increase in the systemic inflammatory response.

Key words: Acute limb ischemia, oxidant and antioxidant activity, markers of inflammation

Authors:

Magamedov I. D., Surgeon of the Department of Vascular Surgery Saint-Petersburg I. I. Dzhanelidze research institute of emergency medicine, Saint-Petersburg, Russia;

Pivovarova L. P., MD, head of the laboratory diagnostics department Saint-Petersburg I. I. Dzhanelidze research institute of emergency medicine, Saint-Petersburg, Russia;

Ariskina O. B., ✉ PhD, Researcher of the laboratory diagnostics department Saint-Petersburg I. I. Dzhanelidze research institute of emergency medicine, Saint-Petersburg, Russia. **E-mail:** olga.ariskina@mail.ru;

Nohrin S. P., MD, senior researcher Department of Vascular Surgery Saint-Petersburg I. I. Dzhanelidze research institute of emergency medicine, Saint-Petersburg, Russia;

Soroka V. V., MD, Head of the Department of Vascular Surgery Saint-Petersburg I. I. Dzhanelidze research institute of emergency medicine, Saint-Petersburg, Russia.

РОЛЬ *CANDIDA ALBICANS* В РАЗВИТИИ ПИЩЕВОЙ ГИПЕРЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ И МЕТАБОЛИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ

© 2019 г. П. С. Новиков^{1,2}, Н. А. Черевко^{1,2}, О. А. Денисенко²,
С. Э. Кондаков³

E-mail: Pavel.N1234@yandex.ru

¹ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет»
Минздрава РФ, Томск, Россия;

²Медицинское объединение Центр Семейной медицины, Томск, Россия;

³Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Москва, Россия

Поступила: 26.02.2019. Принята: 12.03.2019

В настоящее время грибы рода *Candida* претендуют на роль предикторов хронического воспаления и процессов инсулинорезистентности. В работе исследован вклад грибковой сенсибилизации на примере *Candida albicans* в развитие гиперчувствительности к пищевым антигенам и в патогенез метаболического синдрома.

Ключевые слова: *Candida albicans*, пищевая гиперчувствительность, метаболический синдром

DOI: 10.31857/S102872210006474-6

Адрес: 634009 г. Томск, Войкова, 55. Общество с ограниченной ответственностью «Центр Семейной Медицины», Черевко Наталья Анатольевна Тел.+79138205052 (моб.)

E-mail: Pavel.N1234@yandex.ru

Авторы:

Новиков П. С., врач клинической лабораторной диагностики, «Центр семейной медицины», соискатель кафедры патофизиологии СибГМУ, ординатор кафедры судебно-медицинская экспертиза СибГМУ, Томск, Россия;

Черевко Н. А., докт. мед. наук, профессор кафедры иммунологии и аллергологии СибГМУ, директор ООО «Центр семейной медицины», врач аллерголог-иммунолог, Томск, Россия;

Денисенко О. А., врач клинической лабораторной диагностики, заведующий КДЛ МО «Центр семейной медицины», Томск, Россия;

Кондаков С. Э., докт. фарм. наук, ведущий научный сотрудник химического факультета МГУ имени М. В. Ломоносова, Москва, Россия.

АКТУАЛЬНОСТЬ

Более половины населения Земли является носителем грибов рода *Candida*. По данным ВОЗ, пятая часть населения Земли хоть раз перенесла клинические проявления различных локализаций и форм кандидоза. Фактически грибы *Candida* находятся на четвертом месте по частоте среди выделяемых из крови микроорга-

низмов и на первом по смертности от внутрибольничных септических состояний в США [1].

Интенсивно потребляя сахар из крови, *C. alb* может вызвать симптомы гипогликемии и замедлять метаболический обмен, способствуя ожирению.

В настоящее время известно более 150 видов рода *Candida*, в 95% случаев заболевания вызывает *C. alb*. Став патогенной, *C. alb* повреждает стенку кишки, и в кровь начинают проникать не только токсические продукты жизнедеятельности грибка, но и отдельные компоненты пищи, что способствует попаданию пищевых антигенов в кровь с последующим развитием реакций пищевой гиперчувствительности, запуску системных воспалительных реакций и метаболических нарушений [1, 3].

Иммунологический надзор за жизнедеятельностью *C. alb*. (*Candida albicans*) на слизистых осуществляется с участием врожденного иммунитета, связанного с TLR2 и TLR4 типов, локализованных на дендритных клетках, и микробицидной активностью клеток-фагоцитов. Однако, особые антигенные свойства *C. alb*. позволяют ускользать от иммунологического контроля. В результате этого, *C. alb*. приобретает характе-

ристки суперантигена и способность изменять иммуногенные свойства экзо- и ауто-АГ, приводя к нарушениям процессов апоптоза, формированию реакций гиперчувствительности немедленного и замедленного типов [3, 4].

Цель работы. Исследовать вклад грибов *Candida albicans* в развитии пищевой гиперчувствительности и метаболических нарушений.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клиническим материалом служила венозная кровь обследованных волонтеров с разным индексом массы тела. Волонтеры с повышенным ИМТ: женщины 20–55 лет, ИМТ>27, n=35; мужчины 20–60 лет, ИМТ>27, n=35. У волонтеров с ИМТ>29,9 окружность талии составляла >94 см у мужчин, и >80 см у женщин. Волонтеры с нормальным ИМТ: женщины 20–50 лет, 18,5<ИМТ<25, n=15; мужчины 20–50 лет, 18,5<ИМТ<25, n=15. Расширенный анализ крови проводили с использованием гематологического анализатора НЕМОЛУХ. Определение холестерина, триглицеридов, ЛПВП, глюкозы, АЛАТ, АсАТ осуществляли с помощью биохимического анализатора Accent 200. Методом иммуноферментного анализа (ИФА) в сыворотке крови определяли концентрации, ИЛ-6, инсулин, IgG и IgA к *C. Alb* и IgG к 111 пищевым антигенам (пАГ). Рассчитывали индексы инсулинорезистентности и атерогенности. Оценка специфической IgG-зависимой гиперчувствительности к 111 пАГ, объединенных по родственному антигенному, проводилась с использованием многокомпонентного ИФА по методике Immunohealth™ [2].

Статистическую обработку данных проводили в программах Statistica v6.0, SPSS19.0 с использованием U критерия Манна-Уитни, коэффициента ранговой корреляции Спирмена.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При сравнении показателей волонтеров с разным индексом массы тела (ИМТ) было выявлено, что в группе обследованных с повышенным индексом массы тела (ИМТ>27) концентрация холестерина, триглицеридов, ЛПНП, интерлейкина-6 (ИЛ-6), глюкозы, АЛАТ, инсулина, общее количество лейкоцитов (ОКЛ), индексы инсулинорезистентности и атерогенности были статистически значимо повышены (p<0,05) по сравнению с таковыми у волонтеров с нормальным индексом массы тела (18<ИМТ<25). Так-

же у волонтеров с повышенным ИМТ наблюдалось статистически значимое повышение IgG и IgA к *C. alb.* (p<0,05) по сравнению с таковыми у волонтеров с нормальным ИМТ. При этом повышение IgG к *C. alb.* в группе волонтеров с ИМТ>27 по сравнению с волонтерами нормальным ИМТ (18<ИМТ<25) сочеталась с повышенной частотой гиперчувствительности на кластер молочных продуктов 38% и 7% и антигены продуктов семейства бобовых 37% и 16%, также повышением частоты гиперчувствительности на глютен 13% и 0% соответственно. В ходе исследования у волонтеров с ИМТ>27 были выявлены статистически значимые связи между полученными значениями концентраций IgG к пекарским дрожжам (Rs=0,31, p<0,05), IgG к тростниковому сахару (Rs=0,52, p<0,05), повышением уровня глюкозы в сыворотке крови (Rs=0,30, p<0,05) и IgG к *C. alb.* Полученные нами данные показывают наличие связи между показателями пищевой гиперчувствительности к продуктам бродильного кластера (к тростниковому сахару и пек. дрожжам) и *C. alb.*, а также связь между началом развития метаболических нарушений (повышение глюкозы в крови) и увеличением концентрации *C. alb.* Полученные нами данные о связи гиперчувствительности к антигенам бродильного кластера, повышением концентрации глюкозы в сыворотке крови согласуются с результатами исследований американских коллег о роли процессов брожения в тонком кишечнике (гиперчувствительности к продуктам «бродильного» кластера) на фоне дрожжевой сенсibilизации в присутствия повышенного количества дрожжевых грибов рода *Candida albicans*, которые совместно приводят к нарушению процессов метаболизма глюкозы, увеличению ее концентрации в крови, рисками развития сахарного диабета 2 типа и болезни Крона.

Таким образом, нами установлена возможная связь между грибковой сенсibilизацией, развитием реакций пищевой гиперчувствительности и началом развития метаболических нарушений (повышение глюкозы в сыворотке крови).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Колс Е. К. Кандида: грибок внутри нас [Электронный ресурс] – Режим доступа: <http://www.elinahealthandbeauty.com / Articles of Doctor Elena Koles.htm#doc5>
2. Розенштейн А. З., Розенштейн М. Ю., Кондаков С. Э., Черевко Н. А. Современные лабораторные методы диагностики пищевой непереносимости. Бюлле-

- ть сибирской медицины —2016.—т. 15, № 1.— С. 69—79. [Rosenstein A.Z., Rosenstein M.Y., Kondakov S.E., Cherevko N.A. Modern laboratory methods for diagnosing of food intolerance. Bulletin of Siberian Medicine —2016.—t.15, № 1.—p. 69—79.]
3. Burks A.W., Laubach S., Jones S.M. Oral tolerance, food allergy, and immunotherapy: Implications for future treatment Journal of Allergy and Clinical Immunology.— 2008.—Vol. 121, N6.— P. 1344—1350.
 4. Marion C. Humoral Immunity Links *Candida albicans* Infection and Celiac Disease [Электронный ресурс]— United Kingdom, 2015.— Режим доступа: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0121776>

THE ROLE OF *CANDIDA ALBICANS* IN THE DEVELOPMENT OF FOOD HYPERSENSITIVITY AND METABOLIC DISORDERS

© 2019 P. S. Novikov^{1,2}, N. A. Cherevko^{1,2}, O. A. Denisenko², S. E. Kondakov³

E-mail: Pavel.N1234@yandex.ru

¹Siberian State Medical University, Tomsk, Russia;

²Medical Union “Family Medicine Center”, Tomsk, Russia;

³Moscow State University named after M. V. Lomonosov, Moscow, Russia

Received: 26.02.2019. Accepted: 12.03.2019

Currently, *Candida albicans* is considered a predictor of chronic inflammation and insulin resistance. The work investigated the contribution of fungal sensitization on the example of *Candida albicans* in the development of hypersensitivity to food antigens and manifestations of the metabolic syndrome.

Key words: *Candida albicans*, food hypersensitivity, metabolic syndrome

Authors:

Novikov P. S., Doctor of Clinical Laboratory Diagnostics, Family Medicine Center, applicant for the Department of Pathophysiology, SSMU, Resident, Department of Forensic Medical Examination, Siberian State Medical University, Tomsk, Russia;

Cherevko N. A., Doctor of Allergist-immunologist of the highest category, Director of the Center of Family Medicine, Professor of Siberian State Medical University, PhD, Tomsk, Russia;

Denisenko O. A., doctor of clinical laboratory diagnostics, head of KDL MO “Family Medicine Center”, Tomsk, Russia;

Kondakov S. E., Dr. Pharm.Science, Leading Researcher, Faculty of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia.

ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ВИДОВ ФИЗИЧЕСКОЙ НАГРУЗКИ НА СТРУКТУРУ ЛИМФОИДНЫХ ОРГАНОВ У КРЫС РАЗНОГО ПОЛА

© 2019 г. Ю. С. Храмцова^{1,2*}, Н. В. Тюменцева¹, Е. Н. Алтабаева²,
О. С. Арташян^{1,2}

*E-mail: hramtsova15@mail.ru

¹ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии УрО РАН», Екатеринбург, Россия;

²ФГАОУ ВО «УрФУ имени первого Президента России Б. Н. Ельцина», Екатеринбург, Россия

Поступила: 07.03.2019. Принята: 19.03.2019

Полагая, что от интенсивности и длительности физических тренировок зависят особенности структурно-функциональных изменений в лимфоидных органах, целью работы послужило изучение влияния различных видов физической нагрузки на центральные и периферические органы иммуногенеза (тимуса и селезенки) у крыс разного пола. Показано, что независимо от половых различий разные режимы физических тренировок вызывают однотипные структурные изменения со стороны лимфоидных органов, которые приводят к компенсаторной перестройке иммунной системы в ответ на стресс.

Ключевые слова: селезенка, тимус, физическая нагрузка

DOI: 10.31857/S102872210006467-8

Адрес: 620049 г. Екатеринбург, ул. Первомайская, 106, ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии УрО РАН», лаборатории иммунофизиологии и иммунофармакологии, Храмцова Юлия Сергеевна.
Тел.: +79122842464, 8(343)3740070.

E-mail: hramtsova15@mail.ru

Авторы:

Храмцова Ю. С., к.б.н., с.н.с. лаборатории иммунофизиологии и иммунофармакологии, ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии УрО РАН», Екатеринбург, Россия; доцент Департамента биологии и фундаментальной медицины УрФУ, Екатеринбург, Россия;

Тюменцева Н. В., к.б.н., с.н.с. лаборатории иммунофизиологии и иммунофармакологии, ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии УрО РАН», Екатеринбург, Россия;

Алтабаева Е. Н., магистрант УрФУ, Екатеринбург, Россия;

Арташян О. С., к.б.н., с.н.с. лаборатории иммунофизиологии и иммунофармакологии, ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии УрО РАН», Екатеринбург, Россия; доцент Департамента биологии и фундаментальной медицины УрФУ, Екатеринбург, Россия.

Иммунная система играет важную роль в адаптационных реакциях организма, в том числе и при физических нагрузках. В литературе можно встретить противоречивые данные об изменениях, возникающих в иммунной системе, в частности, в центральных и периферических органах иммуногенеза, под влиянием физических тренировок разной интенсивности.

Кроме того, в них не отражаются особенности половых различий в реакциях лимфоидных органов на физические нагрузки.

Полагая, что от интенсивности и длительности физических тренировок зависят особенности структурно-функциональных изменений в лимфоидных органах, целью работы послужило изучение влияния различных видов физической нагрузки на центральные и периферические органы иммуногенеза (тимуса и селезенки) у крыс разного пола.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проведено на 30 крысах (самцах и самках) линии Вистар половозрелого возраста. Общая и чрезмерная физические нагрузки осуществлялись в виде плавания по методике Красновой А. Ф. Общая физическая нагрузка (ОФН) заключалась в непрерывном плавании в течение 2 часов без груза. Чрезмерная физическая нагрузка (ЧФН) – в плавании в течение 4 минут с грузом 20% от веса тела. Эксперимент проводился в течение 5 недель. В последующем животных выводили из эксперимента путем передозировки эфирного наркоза. Для гистологических исследований проводили забор тимуса

и селезенки. Оценку морфометрических показателей проводили на препаратах, окрашенных гематоксилин-эозином. Также оценивали показатели периферической крови и лейкограммы. Статистическую обработку данных проводили с использованием непараметрических методов статистики («Statistica 8.0»). Сравнение групп выполняли с помощью критерия Манна-Уитни. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

Иммунная система включается в процесс приспособления организма к воздействию на него внешних факторов, в том числе и физических нагрузок. Тимус является центральным органом иммуногенеза, поэтому его реакция на различные воздействия приводит к изменению работы всей иммунной системы. В ходе исследования было выявлено, что коэффициент массы тимуса как самок, так и самцов после влияния ОФН не имеет значимого отличия от показателя интактных животных, но при этом наблюдаются значительные изменения морфофункционального состояния органа. У крыс-самцов на 34%, у крыс-самок на 36% снижена доля мозгового вещества за счет увеличения коркового. Толщина капсулы тимуса также уменьшена по сравнению с интактными животными. Предполагается, что увеличение доли коркового вещества тимуса носит компенсаторно-приспособительный характер и это связано с усилением процессов пролиферации и дифференцировки иммунокомпетентных клеток, что подтверждается стабильным увеличением количества лимфоцитов в периферической крови крыс после ОФН.

Селезенка относится к периферическим органам иммунной системы, который выполняет гематологические и иммунологические функции. В ходе исследования было установлено, что коэффициент массы селезенки у самцов после ОФН не имеет значимого отличия от показателя интактных животных, в то время как у самок наблюдается достоверное увеличение этого показателя до $5,77 \pm 2,16$ мг/г по сравнению с интактной группой $2,08 \pm 0,3$ мг/г. В обеих экспериментальных группах зафиксировано увеличение доли красной пульпы (у самцов на 14%, у самок на 17%) за счет снижения площади белой пульпы и утолщение капсулы селезенки. Возможно, сужение белой пульпы связано с выбросом иммунокомпетентных клеток в кровотоки, что также подтверждается данными периферической крови, указывающими на уве-

личение количества лейкоцитов на всем протяжении эксперимента.

При действии ЧФН на организм животных установлены морфоструктурные изменения в тимусе схожие с теми, что отмечаются в опытных группах после ОФН. Это подтверждается данными других исследований, в которых отмечается снижение содержания клеток лимфоидного ряда, увеличение количества эпителиоретикулоцитов и дегенерирующих клеток [1].

Морфометрические исследования селезенки также выявили однотипные изменения у самцов и самок при разных видах физической нагрузки, которые проявились в увеличении доли красной пульпы и утолщении капсулы в 2 раза по сравнению с интактной группой. В связи с тем, что красная пульпа представляет собой «депо» клеток крови, можно предположить, что ее расширение связано с увеличением объема циркулирующей крови. Полученные данные о сужении лимфатических фолликулов белой пульпы подтверждают и результаты других исследований, проведенных только при ЧФН, в которых показано уменьшение всех морфометрических показателей этой структуры в селезенке (проявление реакции «клеточного опустошения») и одновременное увеличение всех показателей маргинальных зон, усиление В-иммунологической реактивности в них [2].

Таким образом, независимо от половых различий разные режимы физических нагрузок вызывают однотипные структурные изменения со стороны лимфоидных органов, которые приводят к компенсаторной перестройке иммунной системы в ответ на стресс.

Работа выполнена в рамках государственного задания ИИФ УрО РАН (тема № АААА-А18-118020590108-7).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Сашенков С. Л., Пылаева И. Л., Колупаев В. А., Долгушин И. И. Влияние окружающей среды на клеточный и гуморальный иммунитет у спортсменов. Гигиена и санитария. 2012, 91(3), 42–44. [Sashenkov S. L., Pylaeva I. L., Kolupaev V. A., Dolgushin I. I. Environmental influences on cellular and humoral immunity in athletes. Hygiene and Sanitation. 2012, 91(3), 42–44].
2. Бахмет А. А. Строение лимфоидных структур селезенки крыс при воздействии острого эмоционального стресса. Морфология. 2004, 125 (1), 55–58. [Bakmet A. A. The architecture of the lymphoid structures of the spleen of rats when exposed to acute emotional stress. Morphology. 2004, 125 (1), 55–58].

THE INFLUENCE OF DIFFERENT PHYSICAL ACTIVITY ON THE STRUCTURE OF LYMPHOID ORGANS IN RATS OF DIFFERENT SEX

© 2019 Y. S. Khrantsova^{1,2*}, N. V. Tyumentseva¹, E. N. Altabaeva²,
O. S. Artashyan^{1,2}

*E-mail: hramtsova15@mail.ru

¹Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch of Russian Academy of Sciences,
Yekaterinburg, Russia;

²Ural Federal University, Yekaterinburg, Russia

Received: 07.03.2019. Accepted: 19.03.2019

Assuming that the peculiarities of structural and functional changes in lymphoid organs depend on the intensity and duration of physical training, the aim of the work was to study the effect of different types of physical activity on the central and peripheral organs of immunogenesis (thymus and spleen) in rats of different sexes. It is shown that regardless of sexual differences different modes of physical training cause the same type of structural changes in the lymphoid organs, which lead to a compensatory restructuring of the immune system in response to stress.

Key words: spleen, thymus, physical activity

Authors:

Khrantsova Y. S., ✉ PhD, laboratory of immunophysiology and immunopharmacology, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch of RAS; Department of biology and fundamental medicine, Ural Federal University, Yekaterinburg, Russia.

E-mail: hramtsova15@mail.ru;

Tyumentseva N. V., PhD, laboratory of immunophysiology and immunopharmacology, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch of RAS, Yekaterinburg, Russia;

Altabaeva E. N., Ural Federal University, Yekaterinburg, Russia;

Artashyan O. S., PhD, laboratory of immunophysiology and immunopharmacology, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch of RAS; Department of biology and fundamental medicine, Ural Federal University, Yekaterinburg, Russia.

ИЗУЧЕНИЕ АНТИМИКРОБНОГО ДЕЙСТВИЯ ГЕКСАХЛОРОПЛАТИНАТА ТРИМЕТИЛАММОНИЯ НА *E. COLI*

© 2019 г. Н. М. Шлепотина^{1*}, О. Л. Колесников¹, Ю. С. Шишкова¹,
И. В. Галагудин¹, А. Р. Ткачёва², В. В. Шарутин²

*E-mail: grant0408@yandex.ru

¹ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет»
Минздрава России, Челябинск, Россия;

²ФГАОУ ВО «Южно-Уральский государственный университет» (НИУ), Челябинск, Россия

Поступила: 28.02.2019. Принята: 15.03.2019

Настоящее исследование представляет собой один из этапов изучения антимикробного действия гексахлороплатината триметиламмония на бактерии *Escherichia coli*.

Ключевые слова: кишечная палочка, *Escherichia coli*, гексахлороплатинат триметиламмония, антимикробное действие

DOI: 10.31857/S102872210006465-6

Адрес: 454092 Челябинск, ул. Воровского, д. 64, ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, кафедра биологии, Шлепотина Нина Михайловна. Тел.: +7 (351) 262-78-23.

E-mail: grant0408@yandex.ru

Авторы:

Шлепотина Н. М., преподаватель кафедры биологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, Челябинск, Россия;

Колесников О. Л., д.м.н., профессор, заведующий кафедрой биологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, Челябинск, Россия;

Шишкова Ю. С., д.м.н., доцент, профессор кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии и клинической лабораторной диагностики ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, Челябинск, Россия;

Галагудин И. В., старший лаборант кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии и клинической лабораторной диагностики ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, Челябинск, Россия;

Ткачёва А. Р., аспирант кафедры теоретической и прикладной химии ФГАОУ ВО «Южно-Уральский государственный университет» (НИУ), Челябинск, Россия;

Шарутин В. В., д.х.н., профессор, главный научный сотрудник управления научной и инновационной деятельности ФГАОУ ВО «Южно-Уральский государственный университет» (НИУ), Челябинск, Россия.

АКТУАЛЬНОСТЬ

Актуальной проблемой микробиологии является резистентность микроорганизмов к анти-

биотикам, антисептикам и дезинфектантам [1]. Это определяет необходимость поиска новых химических соединений, обладающих антимикробным действием. Перспективны в этом отношении соединения платины, ряд из которых может проявлять антимикробные свойства в отношении грамположительных, грамотрицательных и спорообразующих бактерий [2]. Несмотря на высокую стоимость комплексов платины, они могут стать основой для разработки антисептиков резерва при выраженной устойчивости микроорганизмов к другим препаратам.

Цель работы. Определить наличие антимикробного действия гексахлороплатината триметиламмония в отношении *E. coli*.

МЕТОДЫ

В качестве тестируемого вещества с предполагаемыми антимикробными свойствами использовали гексахлороплатинат триметиламмония, синтезированный на кафедре теоретической и прикладной химии ФГАОУ ВО «Южно-Уральский государственный университет» (НИУ), в качестве тест-культуры — эталонный штамм *E. Coli* ATCC 25922. Для определения антимикробной активности водного раствора гексахлороплатината триметиламмония с исходной концентрацией 0,029 моль/л готовили десятикратные разведения: 0,0029; 0,00029; 0,000029; 0,0000029;

0,00000029 моль/л в 0,9% растворе натрия хлорида. В качестве тестируемой культуры использовали взвесь суточной культуры *E. coli* в концентрации 10^8 КОЕ/мл. В день исследования в каждую из пробирок с 0,9 мл раствора гексахлороплатината триметиламмония вносили по 0,1 мл бактериальной взвеси, инкубировали в течение 30 минут при 37 °С с последующим высевом 0,005 мл содержимого пробирок на пластинчатую среду Эндо. Чашки инкубировали при 37 °С в течение 24 часов, а после определяли наличие роста бактерий на среде. В качестве контроля использовали 0,1 мл взвеси *E. coli* в 0,9 мл 0,9% раствора натрия хлорида, также на среду Эндо высевался раствор гексахлороплатината триметиламмония в исходной концентрации.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенных исследований определили, что тестируемая культура *E. coli* штамм АТСС 25922 была жизнеспособной и давала рост на среде Эндо в контрольном исследовании в виде лактозопозитивных колоний. В 0,029 моль/л водном растворе гексахлороплатината триметиламмония без добавления штамма АТСС 25922 *E. coli* культивируемых на среде Эндо микроорганизмов обнаружено не было. При регистрации антимикробного действия гексахлороплатината триметиламмония в концентрациях 0,0029; 0,00029; 0,000029; 0,0000029;

0,00000029 моль/л был обнаружен антиэшерихиозный эффект препарата в концентрациях 0,0029, 0,00029 моль/л.

Таким образом, водный раствор гексахлороплатината триметиламмония в концентрациях 0,0029, 0,00029 моль/л обладает антимикробной активностью по отношению к *E. coli* штамм АТСС 25922. Исследования продолжаются.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Гренкова Т. А., Селькова Е. П., Гусарова М. П., Ершова О. Н., Александрова И. А., Сазыкина С. Ю., Курдюмова Н. В. Контроль за устойчивостью микроорганизмов к антибиотикам, антисептикам и дезинфицирующим средствам. Эпидемиол. и вакцинопрофилактика. 2014, 1 (74), 29–33. [Grenkova T. A., Sel'kova E. P. I., Gusarova M. P., Ershova O. N., Aleksandrova I. A., Sazykina S. Yu., Kurdyumova N. V. Stability control of microorganisms to antibiotics, antiseptics and disinfectants. Epidemiologiya i vaksino profilaktika. 2014, 1 (74), 29–33].
2. Склянкина А. А., Караваева А. В., Яковлев К. И. Изучение антимикробной активности бинадерных комплексов платины (II) с тетразолами. В сб.: Инновации в здоровье нации. Материалы III всероссийской научно-практической конференции с международным участием. СПб 2015, 413–416. [Sklyankina A. A., Karavayeva A. V., Yakovlev K. I. Study of the antimicrobial activity of binuclear platinum (II) complexes with tetrazoles. In: Innovations in health of the nation. Materials of the III All-Russian scientific and practical conference with international participation. St. Petersburg 2015, 413–416].

STUDYING THE ANTIMICROBIAL ACTION OF TRIMETHYLAMMONIUM HEXACHLOROPLATINATE AGAINST *E. COLI*

© 2019 N. M. Shlepotina^{1*}, O. L. Kolesnikov¹, Yu. S. Shishkova¹, I. V. Galagudin¹, A. R. Tkachyova², V. V. Sharutin²

*E-mail: grant0408@yandex.ru

¹Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «South-Urals State Medical University» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Chelyabinsk, Russia;

²Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education «South Ural State University» (National Research University), Chelyabinsk, Russia

Received: 28.02.2019. Accepted: 15.03.2019

This study represents one of the stages of the study of the antimicrobial action of trimethylammonium hexachloroplatinate on bacteria *Escherichia coli*.

Key words: *Escherichia coli*, trimethylammonium hexachloroplatinate, antimicrobial action

Authors:

Shlepotina N. M., ✉ Lecturer of the Department of Biology of Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «South-Urals State Medical University» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Chelyabinsk, Russia.

E-mail: grant0408@yandex.ru;

Kolesnikov O. L., Doctor of Medical Sciences, Professor, Head of the Department of Biology of Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «South-Urals State Medical University» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Chelyabinsk, Russia;

Shishkova Yu.S., Doctor of Medical Sciences, Docent, Professor of the Department of Microbiology, Virology, Immunology and Clinical Laboratory Diagnostics of Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «South-Urals State Medical University» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Chelyabinsk, Russia;

Galagudin I. V., Senior Laboratory Assistant of the Department of Microbiology, Virology, Immunology and Clinical Laboratory Diagnostics of Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «South-Urals State Medical University» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Chelyabinsk, Russia;

Tkachyova A. R., Graduate Student of the Department of Theoretical and Applied Chemistry of Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education «South Ural State University» (National Research University), Chelyabinsk, Russia;

Sharutin V. V., Doctor of Chemical Sciences, Professor, Chief Researcher of Management of Scientific and Innovate Activity of Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education «South Ural State University» (National Research University), Chelyabinsk, Russia.

Авторский указатель

Е		Б	
Eliáš Daniel	981	Багдасарян Т. Р.	870
А		Бажан С. И.	1000, 1024
Абазова З. Х.	124, 174	Базаев А. Л.	270
Абакумов А. И.	335	Байбарина Е. В.	305
Абакумова Т. В.	197, 704	Балаева Ж. Т.	963
Абдурахманов М. М.	435	Балмасова И. П.	144, 281
Абидов М. Т.	930	Балясова Л. С.	858, 891
Абрамов К. С.	127, 130	Баранова О. А.	560
Абрамовских О. С.	236, 377	Барило А. А.	147, 150
Августинович Д. Ф.	623	Барков С. Ю.	984
Авдеева Ж. И.	133, 557	Барова Н. К.	503, 867
Авруцкая В. В.	347	Барсукова Н. И.	620
Азаматова Э. К.	963	Басс Е. А.	153
Азизова З. Ш.	499	Батенева А. В.	716
Айтов А. Э.	489, 641	Баткаева Н. В.	406
Аклеев А. А.	1042, 1045	Баторов Е. В.	142, 942
Актанова А. А.	462	Батрак Н. В.	362
Акулова Е. Б.	136	Батурина И. Л.	828, 936
Акунеева Т. В.	332, 939	Бахирев А. М.	819
Александров Г. В.	807	Бахтиярова К. З.	359
Алтабаева Е. Н.	1060	Бекерова Д. Ф.	264
Альшевская А. А.	302, 707	Бекпергенова А. В.	156
Аль-Шехадат Р. И.	136	Белан Э. Б.	786
Амбарчян Э. Т.	200	Беленюк В. Д.	545
Амбарян С. Г.	876	Белокрылова М. Ф.	445
Амстиславская Т. Г.	397, 638	Беломестнова И. А.	707
Андреев Ю. Ю.	1021	Беляева С. В.	159
Андреева М. А.	278	Бержец В. М.	909
Андреева Е. А.	139	Берзина А. Г.	162
Андреева И. И.	533	Бирюкова А. А.	165
Андрющенко С. В.	156	Бирюкова Е. Н.	804
Антонеева И. И.	197, 704	Бишева И. В.	539
Антонец Д. В.	1000, 1003	Блинова Е. А.	168, 1042, 1045
Анциферова Ю. С.	192, 391, 813	Бовин Н. В.	267, 987
Аптекарь И. А.	939	Богомазов А. Д.	171, 530
Арипова Т. У.	290, 499	Богородский А. О.	719
Арискина О. Б.	468, 1054	Бодиенкова Г. М.	846
Аристова Т. А.	142	Бойко А. С.	183
Ароян А. Р.	554	Бойко Е. Л.	409
Артамонов А. Ю.	710	Бойко М. С.	885
Арташян О. С.	1060	Болков М. А.	1028
Архипова А. Ю.	873	Болховитина Е. Л.	719
Атанесян Е. А.	754	Бондарев В. П.	133, 557
Атретханы К-С. Н.	873	Бондаренко Е. С.	921, 924
Афанасьев С. А.	849	Бондаренко Т. А.	602, 626
Афиногенова В. П.	608	Бондаренко Т. Ю.	722
Афоница И. А.	927	Борзова Н. Ю.	362, 563
Ачасова К. М.	713, 852		

Авторский указатель

Борисова И. В.	150	Г	
Боробова Е. А.	1003	Гаврилова Т. В.	739
Борукаева И. Х.	124, 174	Гаврилюк В. П.	978
Борщевский В. И.	719	Гаврилюк Е. В.	736, 978
Бохан Н. А.	183, 673	Гавриш С. А.	323
Бочарова О. С.	338	Галагудин И. В.	1063
Бочкова М. С.	257	Гамалей С. Г.	575, 716
Боярская П. Н.	951	Гамалея Н. Б.	162
Бриллиант С. А.	766, 1048	Ганковская Л. В.	406, 614
Будихина А. С.	858, 891	Гвоздев И. И.	804
Букреева Е. Б.	966	Гейн О. Н.	739
Буланова А. А.	966	Гейн С. В.	742, 969
Булдакова Ю. А.	208	Гельцер Б. И.	260
Бумай А. О.	483	Генинг С. О.	197, 704
Бунева В. Н.	242, 451	Генинг Т. П.	197, 704
Бурмистрова А. Л.	572, 599	Герасимова Д. Г.	200
Бутова Л. Г.	278	Гервазиева В. Б.	320, 388
Бушмина О. Н.	230	Гетте И. Ф.	766, 930
Быстрова Н. А.	177, 380	Гизингер О. А.	203, 745
Бычкова Н. В.	180	Гитинова М. М.	406
В		Гладкова Е. В.	748
Валиева Ю. В.	725	Глебездина Н. С.	751
Ванько Л. В.	341, 403	Глушков А. Н.	218, 221
Василев Ч. Л.	566	Гоголева Е. А.	468
Василишина А. А.	728	Годовалов А. П.	206, 981
Васильев Ю. М.	1006, 1009	Голенков А. К.	596
Васильева А. Р.	451	Головизнин М. В.	208
Васильева Н. В.	311	Головнева Е. С.	936
Вахитова Ю. В.	359	Гольдина И. А.	212
Веревочкин С. В.	136	Гончарова А. С.	775
Ветлугина Т. П.	183, 374	Горбунов Н. П.	215, 754
Викторов Д. В.	1015	Гордеева Л. А.	218
Виноградов С. Ю.	888	Горенков Д. В.	1018
Винс М. В.	966	Грачев Н. И.	394
Виткина Т. И.	187	Грачева Л. А.	614
Власова А. О.	731	Гребенщиков И. С.	221
Волосникова Е. А.	575	Григорьева Е. С.	459
Волох Ю. В.	1012	Гридунова Л. В.	792
Воробьев Д. С.	1012	Гриценко В. А.	778, 781
Воробьева Е. С.	432	Гумилевская О. П.	455
Воробьева Н. В.	733, 855	Д	
Воробьева О. П.	650, 707	Давлетбаева Г. А.	1038
Воронин Д. Н.	190, 409	Давыдова Е. В.	127, 130
Воронина Е. Н.	218, 227	Дагиль Ю. А.	858, 891
Воронина Л. И.	1028, 1034	Даниленко Е. Д.	575, 716
Воронкина И. В.	834	Данилова Е. И.	224
Ворошилова Т. М.	293	Данилова И. Г.	766, 861, 894
Воскресенская Д. Л.	190, 192	Деева Н. С.	227, 617
Вторушина В. В.	194, 341		

Авторский указатель

Демина Д. В.	168, 650	З	
Демьянов А. В.	728	Забков О. И.	778, 781
Демяшкин Г. А.	432	Завгородний Е. С.	203, 745
Денисенко Е. С.	728	Зайнетдинова Л. Ф.	251
Денисенко О. А.	1057	Зайцева Е. В.	1028, 1034
Дженкова Е. А.	512	Зайцева Л. Ю.	171
Дзех О. Ю.	757	Зайцева Н. С.	254
Диндяев С. В.	760	Закиров Р. Ш.	200
Добрынина М. А.	778, 781	Заморина С. А.	257
Долгарева С. А.	230, 1051	Захаров М. В.	614
Долгова Д. Р.	197, 704	Захаров М. С.	754
Долгополов М. С.	233	Заяц Т. А.	831
Долгополова Е. Л.	267	Зверев В. В.	596
Долгушин И. И.	236, 1042	Здвижкова И. А.	156
Долгушина Н. В.	391	Здор В. В.	260
Друцкая М. С.	873, 876	Зеленова З. В.	400
Дудко С. Г.	1000, 1024	Зенина А. А.	264
Дутова С. В.	239, 299, 521	Зенкова Т. В.	332
Душкин А. В.	623	Зиганшин О. Р.	203, 442, 828, 831
Е		Зиганшина М. М.	267, 987
Евдокимов А. В.	763	Зими́на Е. М.	1015
Елагина К. А.	284	Зиновьев С. В.	480, 772
Емелина А. И.	831	Златник Е. Ю.	270, 775
Емельянов В. В.	766, 930	Зобова С. Н.	545
Емельянов И. В.	828, 912	Зозуля С. А.	273
Емельянова Е. С.	611	Золотарева Е. И.	512
Епанчинцева Е. М.	445	Зольникова О. Ю.	276, 287
Епишев Р. В.	200	Зотова М. А.	912
Ерджанян Л. Л.	347, 365	Зубков А. В.	278, 356
Ермаков А. А.	462	Зурочка А. В.	778, 781
Ермаков Е. А.	242	Зурочка В. А.	778, 781
Ермакова О. В.	769	И	
Ермолина Е. В.	548, 906	И Александра	264
Ерохина С. А.	795	Ибрагимова Л. Г.	789, 1038
Ершов Ф. И.	448	Иванов А. М.	455, 629
Ерыгина Е. Н.	492, 494	Иванов К. М.	906
Ефратова Е. П.	144	Иванов М. Ф.	281
Ешимбетова Г. З.	290	Иванов С. Ю.	432
Ж		Иванова Е. В.	224, 626
Жахов А. В.	728, 754	Иванова О. Ю.	284
Железнова А. Д.	527, 602	Иванова С. А.	451
Жеребятъева О. О.	245	Ивашкин В. Т.	276, 287
Жестков А. В.	281	Ильичёв А. А.	1000
Жиляев Е. В.	314	Илюкина Н. А.	566
Жук И. Е.	1018	Илюха В. В.	784
Жукова Ю. В.	707	Иноятов А. Ш.	647
Журавлева М. О.	248	Ираклионова Н. С.	786
		Исенгулова А. А.	411, 548

Авторский указатель

Исмоилова Д. У.	385	Кнауэр Н. Ю.	462
Ихтиярова Г. А.	435	Кныш С. В.	305
Ищенко А. М.	486, 728, 754	Княжева М. А.	397
К		Князева Е. М.	669
Кабина Н. А.	927	Кобызева П. А.	795
Кадочникова Я. А.	739	Ковалева С. В.	308, 503, 867
Казанцева Д. В.	451	Коваленко Е. А.	462
Казимирский А. Н.	518	Коваленко Е. И.	795
Каландарова А. Н.	290	Козелкова Е. В.	344, 362
Калашникова. А. А.	293	Козлов А. П.	136
Калёнова Л. Ф.	605	Козлов В. А.	168, 653
Калинина А. В.	365	Козлова Т. Ю.	1018
Калиниченко Е. О.	1015	Козлова Я. И.	311
Калиновская Н. Ю.	663	Колбин И. А.	798
Калиновский А. В.	933	Колбина Е. В.	798
Калошин А. А.	1015	Коленчукова О. А.	801, 804
Кальметьева Л. Р.	789, 1038	Колесников О. Л.	1063
Каплин В. С.	792	Колесникова Н. В.	590
Каплина О. Н.	1000, 1024	Колобов А. А.	807
Капрельянц Е. Ю.	492, 494	Колобовникова Ю. В.	496
Карабанова Е. А.	754	Коломоец И. И.	284
Карандашов В. И.	203, 745	Коломоец И. И.	994
Караулов А. В.	394	Колпаков С. А.	924
Кармакова Т. А.	296	Колпакова Е. П.	924
Кармиргодиев А. А.	924	Колыванова С. С.	605
Карнаухов Н. С.	775	Кольцова Е. Н.	314
Карпенко Л. И.	1000, 1024	Комлева М. О.	317
Карпина Н. Л.	915	Комлева Н. В.	317
Карпова М. Р.	239	Конаныхина С. Ю.	608
Карпунина Т. И.	206	Кондаков С. Э.	1057
Карташова О. Л.	474	Кондаков С. Э.	536
Касаткин Д. В.	760	Кондратьева Д. С.	849
Каспаров Э. В.	545	Кондрашова Н. М.	772
Катаева Н. Н.	524	Коненков В. И.	769
Кашенко Э. А.	957, 960	Конищева А. Ю.	320, 388
Кжышковска Ю. Г.	459, 569	Конопля А. А.	323, 882
Кику П. Ф.	584	Конопля А. И.	371, 736
Килина О. Ю.	299, 521	Конопля Е. Н.	471, 810, 978
Киргизова С. Б.	245	Конопля Н. А.	230, 1051
Киреев Ф. Д.	302	Копейкин П. М.	710
Киселевский М. В.	133	Коркмазов А. М.	745
Климкина Т. Н.	338	Коркмазов М. Ю.	745
Климко Н. Н.	311	Корнетова Е. Г.	374, 451
Климов В. И.	1018	Корнилова О. Г.	326
Климова Т. А.	162	Корнюшина Е. А.	632
Клинушкина Е. Ф.	596	Королевская Л. Б.	329, 515
Клычева М. М.	897	Коростелев А. А.	617
Клюшник Т. П.	273	Корошвили В. Т.	542

Авторский указатель

Коршикова М. Ю.	578	Ларкин Б.	784
Коряушкина А. В.	251	Латышева Т. В.	614
Костевич В. А.	215	Лаушкина Ж. А.	302
Костоломова Е. Г.	332, 939	Лахман О. Л.	846
Костюшко А. В.	335, 635	Лахонина Н. С.	208
Котикова А. И.	1045	Лебедев Л. Р.	575, 716, 792
Коцарь А. Г.	611	Лебедева А. И.	849
Коченгина С. А.	127	Левкович А. Ю.	368
Кочуев С. С.	270	Левкович М. А.	365, 368
Кравченко Л. В.	368	Леонова А. Ю.	1012
Красильникова А. К.	813	Леплина О. Ю.	423, 942
Красников В. Е.	666	Лиознов Д. А.	136
Красницкая А. С.	338	Липина Т. В.	638
Кречетова Л. В.	194, 341	Литвинова Е. А.	713, 852
Криволапова И. М.	816	Литвинова Е. С.	371
Кривонкина Е. А.	819	Литвинова Л. С.	257
Кривоносова О. А.	332	Лобачева О. А.	374, 445
Кривых М. А.	326	Логинова Ю. В.	377
Кротенко Н. М.	242	Локтионов А. Л.	380
Крошкина Н. В.	344, 897	Локтионова А. В.	380
Крукиер И. И.	347, 365	Ломтатидзе Л. В.	308, 867
Крячко О. В.	822, 825	Лопатникова Ю. А.	650, 837
Кудревич Ю. В.	828, 831	Лосенок С. А.	810
Кудренко А. С.	673	Лотош Н. Ю.	855
Кудрявцева Т. А.	834	Лукина Г. В.	314
Кудряшова А. В.	350, 353	Лукоянова Л. А.	825
Кузнецова Е. К.	828, 831	Лысак А. А.	187
Кузнецова М. С.	650, 837	Лысюк Е. Ю.	432
Кузьменко Г. Н.	897	Львова М. Н.	623
Кузьмин М. Д.	474	Любимов Д. С.	383
Кузьмина Н. С.	356	Лядова И. В.	870, 915
Кузьмина У. Ш.	359	Ляшенко И. Э.	245
Кузьмичева Н. А.	411, 548	М	
Куклина Е. М.	725, 840	Маврин М. Ю.	975
Кулаков В. В.	733	Магамедов И. Д.	1054
Кулакова Т. С.	299, 521	Магзумова Н. М.	385
Кулешова Н. И.	792	Мазурина С. А.	388
Куликова Г. В.	267	Мазуров В. И.	483
Куликова Е. В.	843	Макарова А. Е.	168
Кумыков В. К.	124	Макарова Г. У.	1038
Курилин В. В.	843, 945	Макеева О. В.	332
Курчевенко С. И.	846	Максимов А. Ю.	775
Куст А. В.	344, 362	Максимчик П. В.	858, 891
Л		Максютов Р. А.	945
Ладынина Л. П.	801	Малиновская В. В.	438
Лазанович В. А.	666	Малков В. А.	305
Лазарев А. И.	757	Малова Е. С.	144
Лакницкая А. О.	203	Мальшев М. Е.	483

Авторский указатель

Мальшкина А. И.	192, 813	Мурашкин Н. Н.	200
Мальшкина Д. А.	391	Муругин В. В.	858, 891
Мальцев В. Н.	611	Муругина Н. Е.	858, 891
Мандель А. И.	183	Мусаходжаева Д. А.	385, 435
Маркелова Е. В.	394, 584	Муслимов С. А.	849
Маркина Л. Д.	264	Мухлынина Е. А.	864
Маркова Е. В.	212, 397	Н	
Мартынов А. И.	400	Назаренко О. В.	136
Мартынов Б. В.	629	Назаров С. Б.	897
Материкин А. И.	200	Наймушина Ю. В.	936
Матросова Т. А.	299	Нарзуллаева Н. С.	435
Махалова Г. О.	245	Невежкина Т. А.	581
Машарский А. Э.	136	Невинский Г. А.	242
Машошина Д. О.	177	Недоспасов С. А.	873, 876
Медведева С. Ю.	861	Некрасова И. В.	751
Межевова И. В.	921, 924	Некрасова К. А.	728, 754
Мезенцева Е. А.	798	Нелюбин В. Н.	432
Мелентьев В. С.	843	Ненашева Т. А.	870, 915
Меликян С. Г.	524	Нестерова И. В.	308, 438, 503, 867
Менжинская И. В.	403	Нефедьева Ю. В.	442
Меркулов В. А.	557	Нечкин А. В.	1031
Меркушова Е. Д.	406	Никашина А. А.	347
Мещеряков А. В.	248	Никитин В. Ю.	455, 629
Милеева П. Л.	409	Никитина В. Б.	183, 445
Милованова А. В.	278	Никитина И. Ю.	870, 915
Мирзаева И. В.	462	Никитина С. Г.	273
Миронов А. Ю.	245	Никитина Т. Н.	1018
Миронова А. Р.	156	Никифоров В. С.	1042
Мирошниченко И. В.	411, 548	Никифоров И. А.	224, 626
Мирсаяпова И. А.	1038	Николаева М. А.	194, 341
Михайлова Е. А.	245	Никонова С. Е.	506
Михайлова И. В.	411, 548	Никонова Т. И.	377, 509, 912
Михайлова Н. А.	448, 1012, 1015	Нikuшкина К. В.	509, 912
Михин В. П.	736	Новиков П. С.	1057
Мишинов С. В.	933	Новикова И. А.	512
Мойсенович М. М.	873	Новицкий В. В.	496, 966
Молокова А. В.	414, 417	Новожеева Т. П.	669
Монахова В. С.	728	Нокель А. Ю.	267, 987
Мордвинов В. А.	623	Носенко М. А.	873, 876
Мордык А. В.	554	Нохрин С. П.	1054
Моренкова А. Ю.	420	Нузова О. Б.	879
Морозов С. А.	423	О	
Морозова Н. В.	474	Облеухова И. А.	843
Морозова О. В.	448	Обухова Л. Е.	620
Москалец О. В.	426, 429	Огурцова А. Д.	614
Мудров В. П.	432	Оленникова Р. В.	218
Мун С. А.	218	Олефир Ю. В.	326
Мурашев Б. В.	136	Олина А. А.	751

Авторский указатель

Омашарифа Ж. П.	323, 882	Понасенко А. В.	617
Омельченко В. О.	653	Пономарева Н. А.	284
Орлов Д. С.	710	Попова И. Г.	897
Орлов Н. Б.	769	Попова Л. Л.	281
Орлова Е. С.	632	Попова Л. П.	474
Осиков М. В.	127, 885	Попова М. М.	921
Осипова И. В.	468	Порядин Г. В.	518
Оспельникова Т. П.	388, 448	Прокопьева В. Д.	183
Останин А. А.	142, 423, 942	Прокофьева Ю. В.	736
П		Пролыгина Д. Д.	789, 1038
Павленко В. Н.	867	Пронкина Н. В.	423
Панащатенко А. С.	353	Просекова Е. В.	233, 477
Панкратенко Т. Е.	426	Прохорова А. П.	784
Панова И. А.	350, 353	Пушкарева Л. А.	411, 548
Панфилова Т. В.	527, 602	Пыхова Л. Р.	236
Панченко П. С.	924	Пятикова М. В.	368
Параскун А. А.	888	Р	
Паршукова Д. А.	451	Рагимбекова М. Р.	174
Пасман Н. М.	139, 942	Рагулина В. А.	975, 994
Патрушев А. В.	455	Радаева О. А.	900
Патышева М. Р.	459, 569	Раджабова Н. Р.	563
Пашкина Е. А.	168, 462	Радыгина Т. В.	200
Пашкова И. А.	590	Радьков И. В.	480
Пашкова Т. М.	474	Раев М. Б.	257
Пашнина И. А.	465, 816	Раймуев К. В.	483
Пащенко А. Л.	951	Рак А. Я.	486
Пащенко М. В.	858, 891	Ращупкин И. М.	903
Пенечко Е. М.	533	Ремизова И. И.	489, 641
Первов Ю. Ю.	338	Родин С. В.	728, 754
Перевозчикова Т. В.	669	Рожков А. В.	347
Перунова Н. Б.	156, 626	Рокотянская Е. А.	350, 353
Петричук С. В.	200	Романов В. А.	492, 494
Петров А. В.	807	Романова Е. В.	496
Петров С. А.	954	Романова Н. В.	492, 494
Петров Ю. А.	347	Ромашин Ф. А.	760
Петухова Е. С.	1012	Рудницкий В. А.	445
Пивоварова Л. П.	468, 1054	Рудобаба Е. Л.	786
Пинегин Б. В.	858, 891	Рузибакиева М. Р.	499
Плеханова Н. Г.	1015	Русанова Т. С.	578
Плехова Н. Г.	480, 772	Русинова Т. В.	503, 867
Плотникова М. О.	927	Рыбчинская И. И.	906
Поздина В. А.	894	Рыжикова Г. Н.	994, 1051
Поленок Е. Г.	218	Рябова Л. В.	506, 509
Полоников А. В.	530	Рябчикова Е. И.	575
Полторац А. Е.	236	С	
Полторац А. Н.	784	Сабыныч В. А.	587
Польща Н. Г.	299, 521	Савкин И. В.	212
Поляков Д. В.	471, 810	Савочкина А. Ю.	236, 912

Авторский указатель

Савчук К. С.	509	Смахтин М. Ю.	542, 644
Сагакянц А. Б.	512, 921	Смахтина А. М.	542, 644
Садыгова А. В.	362	Смердова М. А.	1021
Садыкова Г. К.	751	Смирнов В. С.	834
Сазонова Т. А.	807	Смирнова А. В.	362
Сайдакова Е. В.	329, 515	Смирнова А. О.	719
Салмаси Ж. М.	518	Смирнова Л. П.	242, 451
Самойликов П. В.	909	Смирнова С. В.	147, 150, 804
Самусева И. В.	912	Смольникова М. В.	545, 948
Сапожников А. М.	719	Смолягин А. И.	317, 548
Саранчина Ю. В.	299, 521	Смык А. В.	551
Саркисян Н. Г.	524	Снимщикова И. А.	927
Сарычева Ю. А.	527, 602	Сокол Н. Н.	554
Сахно Л. В.	903, 997	Соколов А. В.	215
Свиридов В. В.	356	Соколова К. В.	930
Свитич О. А.	406, 596, 614	Соколова Т. Ф.	554
Святченко В. А.	722	Солдатенкова А. В.	1015
Селедцова Г. В.	957, 960	Солдатов А. А.	133, 557
Селищева А. А.	855	Соловьева Е. Д.	933
Сельков С. А.	632	Соловьева Э. Ю.	560
Семенихин А. А.	394	Солонский А. В.	673
Семенова И. Б.	1012	Сорока В. В.	1054
Семке А. В.	242, 374	Сорокин А. В.	1051
Сенников С. В.	302, 837	Сотникова Д. Д.	335
Сенникова Ю. А.	650, 707	Сотникова Н. Ю.	563, 813
Сердюк Я. В.	870, 915	Стадников А. А.	411, 879
Серёжкина А. В.	530	Станкова Н. В.	162
Серёжкина А. С.	171	Старикова Э. А.	834
Серикова Л. Н.	736	Старкина О. В.	566
Серова Т. А.	539, 608	Старостина Е. В.	1003, 1024
Сидлецкая К. А.	187	Старостина Н. М.	423
Сидоров А. В.	278, 1012	Стахеева М. Н.	459, 569
Сидорова Л. П.	766	Стаценко К. Г.	921
Сидорова О. Н.	581	Шашкевич Д. С.	159, 572
Сизиков А. Э.	420, 707	Степанов О. Г.	438
Сизякина Л. П.	254, 533, 918	Степанова Л. В.	804
Силков А. Н.	945	Столяр С. В.	801
Симашкова Н. В.	273	Стрельцова М. А.	795
Симбирцев А. С.	728, 754, 900	Студеникин А. В.	879
Симонян Е. В.	885	Студенников А. Е.	221
Ситдикова Т. С.	477	Ступак В. В.	933
Ситковская А. О.	921, 924	Суздальцев А. А.	281
Ситникова А. В.	966	Сулутьян А. Э.	420
Ситникова О. Г.	897	Сумеркина В. А.	936
Скирневская А. В.	536	Суняйкин К. И.	644
Слатинова О. В.	539, 608	Суняйкина О. А.	177
Слащева О. М.	293	Суслова Т. А.	572
Слонимская Е. М.	459	Сутормин О. С.	804

Авторский указатель

Сухарев А. В.	455	Ф	
Сухарева М. С.	710	Федин А. И.	560
Сухачев А. Н.	710	Федоренко Т. В.	590
Сухина И. А.	455, 629	Федорина А. С.	719
Суховой Ю. Г.	332, 939	Федоров А. А.	459
Сысоева Г. М.	575, 792	Федорова А. В.	593
Сычугов Г. В.	831	Федоскова Т. Г.	400
Т		Феофанова Т. В.	400
Тарабановская Н. А.	459, 569	Фетисова И. Н.	409
Тарабрина О. В.	578	Филатенкова Т. А.	710
Тараканов В. А.	503, 867	Филина А. Б.	596
Таран А. М.	825	Филипенко М. Л.	218, 227
Ташкина Е. А.	942	Филиппова Л. В.	311
Телегина О. В.	284	Филиппова С. Ю.	921
Телешева Л. Ф.	251, 936	Филиппова Ю. В.	602, 879
Темиржанова Ф. Х.	174	Филиппова Ю. Ю.	599
Тендрякова С. П.	972	Фисенко В. Г.	951
Терещенко В. П.	843, 945	Фишер И. В.	954
Терещенко С. Ю.	545, 948	Фишер Т. А.	605, 954
Терновой В. А.	722	Фоменков И. С.	432
Тетруашвили Н. К.	194, 341	Фомина Л. О.	778, 781
Тимганова В. П.	257	Фомина М. В.	245
Тимофеев В. Т.	208	Фомина О. И.	951
Тихонов В. В.	411	Фошина Е. П.	539, 608
Тихонова М. А.	420, 903	Фролов Б. А.	527
Ткачёва А. Р.	1063	Фролова Е. В.	311
Тлакадугова М. Т.	963	Х	
Токарева А. А.	527, 602	Хабалова Т. С.	957, 960
Топтыгина А. П.	1021	Хабирова Т. Г.	483
Торопицын С. А.	206	Хаджибаев Ф. А.	499
Трофимов А. В.	162, 486, 728, 754	Хазиахматова О. Г.	257
Трунов А. Н.	769	Хайруллина Р. М.	1038
Тузанкина И. А.	524, 1034	Халтурина Е. О.	438
Тулупова М. С.	581, 635	Хамошина М. Б.	581
Туляев Я. А.	984	Ханарин Н. В.	299, 521
Туркина С. В.	786	Хантакова Ю. Н.	843, 945
Турмова Е. П.	584	Хараева З. Ф.	963
Турянская А. И.	477, 587	Харина А. С.	335
Тыринова Т. В.	903, 933	Харитоновна М. В.	918
Тюменцева Н. В.	1048, 1060	Хасанова Е. М.	406
Тютюмова Е. А.	560	Хасбиуллина Н. Р.	267, 987
У		Холименко И. М.	611
Ульянова Е. П.	512	Хоменко Р. М.	822
Ульянова Л. И.	162	Хонина Н. А.	139, 593
Унгер И. Г.	332, 939	Хорева М. В.	614
Уразова О. И.	496, 966	Хорляков К. В.	975
Устинов В. А.	221	Хорлякова О. В.	230
Учеваткина А. Е.	311	Храмцов П. В.	257

Авторский указатель

Храмцова Ю. С.	1060	Швец О. Ю.	332
Худякова М. И.	536	Шевела Е. Я.	903, 997
Хуснатдинова Е. А.	326	Шевченко М. А.	719
Ц		Шевченко Ю. А.	650
Цейтлер Т. А.	766	Шевырев Д. В.	653
Цепокина А. В.	227, 617	Шелухина А. Н.	978
Цигулева О. А.	620	Шибзухова Л. А.	124
Цыганов М. А.	623	Шилов Д. Ю.	981
Ч		Шилов С. Ю.	981, 984
Чагина Е. А.	335, 951	Шилов Ю. И.	981, 984
Чайникова И. Н.	224, 626	Шилова Н. В.	267, 987
Чеканов А. В.	560	Ширинский В. С.	657
Челпаченко О. Е.	224, 626	Ширинский И. В.	165, 660
Чемодакова К. А.	629	Ширшов О. В.	411
Чепанов С. В.	632	Ширяева А. В.	305
Чепурнова Н. С.	635	Шишкова Ю. С.	798, 1063
Чердынцева Н. В.	459, 569	Шкаруба Н. С.	707
Черевко Н. А.	536, 1057	Шкатова Н. Г.	906
Черешнев В. А.	739, 816	Шлепотина Н. М.	1063
Черешнева М. В.	739	Шляхтенко Т. Н.	632
Чернов С. В.	933	Шмагель К. В.	515, 990
Черных В. В.	769	Шмагель Н. Г.	515
Черных Е. Р.	420, 423	Шмидт Е. И.	314
Честнихина А. Д.	927	Шмулевич С. А.	227, 617
Четвернина Е. А.	236	Шнайдер М. А.	663
Чижова Н. Д.	638	Шомахова З. А.	963
Чистякова Г. Н.	489, 641	Шорохова В. А.	870
Чкадуа Г. З.	858, 891	Штоббе А. А.	423
Чудилова Г. А.	308, 503, 867	Шульгинова А. А.	177, 994
Чудотворов К. Н.	632	Шуматов В. Б.	480, 666
Чуланова А. А.	542, 644	Шушпанова О. В.	669
Чумакова С. П.	966	Шушпанова Т. В.	669, 673
Чумасова О. А.	420, 707	Щ	
Чурина Е. Г.	966	Щеглова Е. Л.	554
Чурсанова Е. Н.	719	Щеголев А. И.	267
Ш		Ю	
Шабалдин А. В.	227, 617	Юдина С. М.	578, 819
Шабалдина Е. В.	227	Юрова К. А.	257
Шамова О. В.	710	Юшков Б. Г.	1048
Шандаков П. И.	299, 521	Я	
Шапошников А. В.	512	Яковлев А. А.	335
Шаравьева И. Л.	969, 972	Яковлева О. В.	864
Шарипова В. Х.	499	Янишевская М. А.	1045
Шаропов С. Г.	647	Янковская А. А.	997
Шарутин В. В.	1063		
Шатохин М. Н.	611, 975		
Шафигуллина З. А.	861		

