

**ТЕМАТИЧЕСКИЙ ВЫПУСК, ПРИУРОЧЕННЫЙ К ПЕРМСКОМУ  
НАУЧНОМУ ФОРУМУ (2 -4 ИЮЛЯ 2015, г. ПЕРМЬ),  
ОБЪЕДИНЯЮЩЕМУ XII КОНФЕРЕНЦИЮ ИММУНОЛОГОВ УРАЛА,  
СИМПОЗИУМ ПО ПЕРВИЧНЫМ ИММУНОДЕФИЦИТАМ «J PROJECT»  
И II ВСЕРОССИЙСКУЮ ШКОЛУ-КОНФЕРЕНЦИЮ МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ  
«СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ МИКРОБИОЛОГИИ,  
ИММУНОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ»**

**Организаторы конференции**

Федеральное агентство научных организаций  
Уральское отделение Российской академии наук  
Пермский научный центр УрО РАН  
Министерство образования и науки Пермского края  
Министерство здравоохранения Пермского края  
Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН  
Институт иммунологии и физиологии УрО РАН  
Институт органического синтеза УрО РАН  
Институт технической химии УрО РАН  
Пермский государственный национальный исследовательский университет  
Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина  
Российское научное общество иммунологов  
Уральское общество иммунологов, аллергологов и иммунореабилитологов  
Международный образовательный проект по первичным иммунодефицитам «J Project»  
МОО «Микробиологическое общество»  
Всероссийская биологическая ассоциация «Симбиоз Россия»

При финансовой поддержке РФФИ и Министерства образования и науки Пермского края

**ПРЕДСЕДАТЕЛЬ ОРГКОМИТЕТА ФОРУМА**

В.А. Черешнев – академик РАН (Екатеринбург),  
президент Российского Научного Общества Иммунологов (РНОИ)

**XII КОНФЕРЕНЦИЯ ИММУНОЛОГОВ УРАЛА**

**ЗАМЕСТИТЕЛИ ПРЕДСЕДАТЕЛЯ**

К.В. Шмагель, д.м.н. (Пермь)

М.Б. Раев, д.б.н. (Пермь)

С.А. Заморина, д.б.н. (Пермь)

**ОРГАНИЗАЦИОННЫЙ И НАУЧНЫЙ КОМИТЕТ:**

Бахметьев Б.А., к.м.н., доцент (Пермь)	Ризоπουлу А.П., д.б.н. (Москва)
Гаврилова Т.В., д.м.н., профессор (Пермь)	Серебряная Н.Б., д.м.н., профессор (С.-Петербург)
Гейн С.В., д.м.н., профессор (Пермь)	Симбирцев А.С., д.м.н., профессор (С.-Петербург)
Долгушин И.И., д.м.н., чл.-корр. РАН (Челябинск)	Сотникова Н.Ю., д.м.н., профессор (Иваново)
Зурочка А.В., д.м.н., профессор (Челябинск)	Стрельников В.Н., д.т.н., профессор (Пермь)
Калинина Н.М., д.м.н., профессор (С.-Петербург)	Суховой Ю.Г., д.м.н., профессор (Тюмень)
Кетлинский С.А., д.м.н., чл.-корр. РАН (С.-Петербург)	Тотоян А.А., д.м.н., чл.-корр. РАН (С.-Петербург)
Козлов И.Г., д.м.н., профессор (Москва)	Тузанкина И.А., д.м.н., профессор (Екатеринбург)
Колесникова Н.В., д.б.н., профессор (Краснодар)	Ханферян Р.А., д.м.н., профессор (Москва)
Marodi L., PhD, MD, prof. (Венгрия, Дебрецен)	Чарушин В.Н., д.х.н., академик РАН (Екатеринбург)
Некрасова И.В., к.б.н. (Пермь)	Черешнева М.В., д.м.н., профессор (Екатеринбург)
Орлова Е.Г., к.б.н. (Пермь)	Чупахин О.Н., д.х.н., академик РАН (Екатеринбург)
Продеус А.П., д.м.н., профессор (Москва)	Шилов Ю.И., к.м.н., доцент (Пермь)

# II ВСЕРОССИЙСКАЯ ШКОЛА-КОНФЕРЕНЦИЯ МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ «СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ МИКРОБИОЛОГИИ, ИММУНОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ»

## Заместители председателя:

В.А. Демаков, чл.-корр. РАН, д.м.н. (Пермь)

А.В. Ахова, к.б.н. (Пермь)

А.В. Криворучко, к.б.н. (Пермь)

## ОРГАНИЗАЦИОННЫЙ И НАУЧНЫЙ КОМИТЕТ

Гриценко В.А., д.м.н., профессор (Оренбург)

Нестерова Л.Ю., к.б.н. (Пермь)

Ерошенко Д.В. (Пермь)

Октябрьский О.Н., д.б.н., профессор (Пермь)

Ившина И.Б., чл.-корр. РАН, д.б.н. (Пермь)

Плотникова Е.Г., д.б.н. (Пермь)

Козлов С.В., к.б.н. (Пермь)

Самойлова З.Ю., к.б.н. (Пермь)

Коробов В.П., к.м.н., доцент (Пермь)

Серебренникова М.К., к.б.н. (Пермь)

Куюкина М.С., д.б.н., профессор (Пермь)

Ткаченко А.Г., д.м.н., профессор (Пермь)

Литвиненко Н.И., к.б.н., профессор (Пермь)

Ушаков В.Ю., к.б.н. (Пермь)

Мавзютов А.Р., д.м.н., профессор (Уфа)

Шумихин С.А., к.б.н. (Пермь)

## ТЕХНИЧЕСКИЙ КОМИТЕТ ФОРУМА

Смарцалов К.Н., Мульменко Е.Г., Королевский С.А.

## ГЕНЕРАЛЬНЫЕ СПОНСОРЫ:



**KEDRION**  
B I O P H A R M A

## ГЛАВНЫЕ СПОНСОРЫ:



## ОФИЦИАЛЬНЫЕ СПОНСОРЫ:



## УЧАСТНИКИ ВЫСТАВКИ:



## ИНФОРМАЦИОННОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ:

Российский иммунологический журнал

<http://www.iegм.ru/>

<https://vk.com/event87339815>

## СОДЕРЖАНИЕ

---

Том 9 (18), Номер 2 (1), Июнь 2015

---

РАЗДЕЛ 1 ИММУНОФАРМАКОЛОГИЯ	5
РАЗДЕЛ 2 ЦИТОКИНЫ И ЦИТОКИНОТЕРАПИЯ	55
РАЗДЕЛ 3 ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ СИСТЕМЫ	117
РАЗДЕЛ 4 ИММУННЫЕ МЕХАНИЗМЫ	175
РАЗДЕЛ 5 ИММУНОЛОГИЯ РЕПРОДУКЦИИ И ОНТОГЕНЕЗА	365
РАЗДЕЛ 6 АУТОИММУНИТЕТ	443
РАЗДЕЛ 7 ИММУНОБИОТЕХНОЛОГИЯ И МЕДИЦИНСКАЯ ХИМИЯ	479
РАЗДЕЛ 8 ИММУНИТЕТ И ИНФЕКЦИЯ, ВИЧ	519
РАЗДЕЛ 9 ГЕНОМИКА ИММУНИТЕТА	543
РАЗДЕЛ 10 ВОПРОСЫ ПРЕПОДАВАНИЯ ИММУНОЛОГИИ	573

---

## СОДЕРЖАНИЕ

---

Том 9 (18), Номер 2 (1), Июнь 2015

---

<b>II ВСЕРОССИЙСКАЯ ШКОЛА-КОНФЕРЕНЦИЯ МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ «СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ МИКРОБИОЛОГИИ, ИММУНОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ»</b>	<b>579</b>
<b>РАЗДЕЛ 1 ЭКОЛОГИЯ И ГЕНЕТИКА МИКРООРГАНИЗМОВ</b>	<b>581</b>
<b>РАЗДЕЛ 2 ФИЗИОЛОГИЯ И МЕТАБОЛИЗМ МИКРООРГАНИЗМОВ</b>	<b>627</b>
<b>РАЗДЕЛ 3 ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ МИКРО- И МАКРООРГАНИЗМОВ</b>	<b>683</b>
<b>РАЗДЕЛ 4 ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ В БИОТЕХНОЛОГИИ</b>	<b>719</b>
<b>АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ</b>	<b>771</b>

---

# Раздел 1

# **ИММУНОФАРМАКОЛОГИЯ**

## МУКОЗАЛЬНЫЕ ЭФФЕКТЫ ПОЛИОКСИДОНИЯ В ТЕРАПИИ СОПРОВОЖДЕНИЯ ХИМИОЛУЧЕВОГО ЛЕЧЕНИЯ ПЛОСКОКЛЕТОЧНОГО РАКА ОРОФАЦИАЛЬНОЙ ЗОНЫ

Альтман Е. В.

ГБОУ ВПО Южно-Уральский государственный медицинский университет,  
Челябинск, Россия

Применение иммуномодулятора Полиоксидония в терапии сопровождения химиолучевого лечения рака слизистой полости рта показало его нормализующее влияние на протективные факторы врожденного иммунитета, антителообразование, процессы детоксикации. Выраженная антитоксическая активность препарата, связанная с его высокомолекулярной природой и высокой сорбционной способностью, позволяет широко применять иммуномодулятор Полиоксидоний в комплексном лечении рака орофациальной зоны, что наряду с выраженным иммуномодулирующим эффектом способствует профилактике развития лучевых мукозитов.

*Ключевые слова:* рак слизистой полости рта, полиоксидоний, мукозальный иммунитет.

Применение химиолучевой терапии в лечении плоскоклеточного рака слизистой оболочки полости рта сопровождается развитием лучевых мукозитов различной степени тяжести [1]. Состояние мукозального барьера ротовой полости непосредственно зависит от протективных, репаративных свойств слизистых оболочек, непрерывного контакта с секретами слюнных желез, состояния микрофлоры. Базисная антиколониционная активность секретов усиливается за счет антител, продуцируемых мукозоассоциированной лимфоидной тканью. Содержание в мукозаливарном секрете антиадгезивных, биостатических, биоцидных факторов, иммунокомпетентных клеток, цитокинов во многом определяет возникновение, течение и исход многих патологических процессов ротовой полости [2]. Применение иммуномодуляторов локального и системного действия с целью снижения частоты и выраженности лучевых мукозитов является перспективным направлением иммуноонкологии.

Целью исследования явилось изучение мукозальных эффектов иммуномодулятора Полиоксидония в терапии сопровождения химиолучевого лечения плоскоклеточного рака ротовой полости II, III стадии.

**Материалы и методы.** Исследование проводилось на базе отделения радиологии Челябинского окружного областного онкологического диспансера. Клинически и иммунологически обследовано 26 пациентов с гистологически верифицированным плоскоклеточным раком СОПР II–III стадии (1 группа – до лечения), средний возраст которых составил  $58 \pm 2,4$  года. Все пациенты получали химиолучевую (ХЛТ) терапию в режиме динамического (3 фракции по 4 Гр, затем с разовой дозой 2 Гр, 5 раз в неделю до суммарной очаговой дозы 38–40 Гр) или традиционного фракционирования (5 фракций по 2 Гр, 5 раз в неделю до суммарной очаговой дозы 44 Гр). Методом простой рандомизации все пациенты 1 группы разделены на 2 равновеликие группы: 13 чел. получали только ХЛТ (2 группа – после ХЛТ); 13 чел. получали ХЛТ в сопровождении Полиоксидония (3 группа – после ХЛТП). Полиоксидоний вводили внутривенно капельно 6 мг 1 раз в сутки по схеме в 1, 2, 4, 7, 10, 13 дни и параллельно ежедневно 2 раза в день проводилась обработка слизистых ротовой полости препаратом в стандартном рабочем разведении. Курсовая доза 36 мг. Контрольную группу (4) составили 20 условно-здоровых лиц, средний возраст которых составил  $52,5 \pm 3,2$  года.

Забор мукозаливарного секрета производили утром, натощак всем пациентам до начала лучевой терапии и на 14 сутки от начала терапии. Содержание sIgA, IgA, IgM, IgG и субклассов G1- G4, компонентов комплемента C3a-C5a и лактоферрина определяли при помощи тест-систем для ИФА ЗАО «Вектор-Бест», г. Новосибирск. Учет производили на планшетном спектрофотометре Multiscan Plus (Финляндия), результаты выражали в мг/мл. Общую активность комплемента определяли по 50% гемолизу (CH50). Содержание белка и муцина определяли методом осаждения в модификации Коробейниковой Э. Н. (2002). Количество белка и муцина находили по калибровочному графику, который строили по стандартным растворам альбумина с концентрацией 0,05; 0,10; 0,20; 0,40; 0,50 мкг/мл. Количество белкой составляющей молекулы муцина (MUC-1) (Ед/мл) определяли методом ИФА (реактивы М20№ 228 «Хема»).

**Результаты и обсуждение.** Сопоставление количественных параметров протективных, антиколониционных компонентов мукозального иммунитета ротовой полости и отсутствие значимых различий уровня белка до ( $8,3 \pm 2,3$  мг/мл) и после ( $12,3 \pm 4,3$  мг/мл) проведения химиолучевого лечения позволило предполагать минимальное влияние ХЛТ на содержание белка, содержащегося в мукозаливарном секрете. Некоторое увеличение уровня белка после ХЛТ вероятно связано с явлениями гипосаливации и повышением вязкости секретов. Содержание белка после ХЛТ в сопровождении Полиоксидония, достоверно не изменялось ( $7,9 \pm 2,2$  мг/мл) и было сопоставимо с контрольной группой ( $10,3 \pm 3,2$  мг/мл). Учитывая, что защита слизистых оболочек от любой агрессии имеет многоуровневый характер, мы изучили содержание в мукозальном секрете изменение количества муцина – гликопротеина, обладающего антиадгезивными свойствами. Нами установлено, что у пациентов с раком СОПР, до лечения наблюдалось выраженное и достоверное снижение общего количества муцина в секрете ( $0,07 \pm 0,01$  г/л), еще более снижаясь после проведения ХЛТ ( $0,04 \pm 0,02$  г/л), что свидетельствует о нарушении синтеза муцинов специализированными экзокринными бокаловидными клетками, расположенными интраэпителиально, что может быть определенным фоном для развития онкопроцесса в СОПР. В свою очередь,

содержание протеиновой части молекулы муцина – апомуцина (MUC-1) в секрете у больных до лечения было самым высоким среди изучаемых групп больных ( $49,4 \pm 7,3$  ЕД/мл), достоверно снижаясь после химиолучевой терапии ( $22,5 \pm 2,2$  ЕД/мл), а в группе после проведения ХЛТП его уровень достиг показателей контрольной группы ( $27,3 \pm 5,3$  ЕД/мл), что отражает позитивное нормализующее действие Полиоксидония на восстановление антиадгезивной активности слизистых и может служить фактором протекции слизистых от инфекционно-воспалительных осложнений ХЛТ.

Количество лактоферрина, маркерного белка специфических гранул нейтрофилов, после проведения ХЛТ достоверно снизилось ( $987,5 \pm 34$ , нг/мл) в сравнении с группой до лечения ( $1952 \pm 134,2$  нг/мл) и контрольной ( $1804,3 \pm 129,3$  нг/мл), что вероятно связано с нейтропеническими осложнениями ХЛТ, при этом, в группе после ХЛТП снижение количества лактоферрина обнаружено лишь на уровне тенденции ( $1234,2 \pm 98,7$  нг/мл), не достигающей степени статистической достоверности.

Показатель общей гемолитической активности комплемента в группе после ХЛТ имел самые низкие значения ( $15,3 \pm 2,5$  у.е.) в сравнении с остальными группами, в силу токсического влияния ХЛТ на клетки-продуценты. В этой связи, можно предположить, что Полиоксидоний оказывает выраженное цитопротективное действие, на что указывает отсутствие достоверных различий данного показателя с контрольной группой ( $25,2 \pm 6,2$  у.е. после ХЛТП;  $28,3 \pm 3,1$  у.е. в контрольной группе). Уровни фрагментов комплемента C3a и C5a, обладающих, в том числе, свойствами триггеров иммунного воспаления в тканях, изменялось неоднозначно. Так, содержание C3a фрагмента не имело различий среди изучаемых групп, а количество C5a было повышено в группе до лечения ( $12,1 \pm 3,01$  мг/мл) в сравнении с контрольной группой ( $5,7 \pm 1,4$  мг/мл) и группой после ХЛТ ( $7,3 \pm 1,94$  мг/мл). Анафилотоксины (C3a, C5a, C4a) способствуют дегрануляции тучных клеток, освобождению гистамина, простагландинов, лейкотриенов, IL-1, IL-6, а также обладают свойствами хемоаттрактантов для полиморфноядерных и тучных клеток. Содержание секреторного иммуноглобулина А и иммуноглобулинов первичного иммунного ответа (IgM) в муко-

саливарном секрете после проведения ХЛТ было достоверно снижено ( $6,56 \pm 1,2$  мг/мл) в сравнении с группой пациентов до лечения ( $11,5 \pm 2,4$  мг/мл), что может быть следствием, как снижения антигенной нагрузки на индуктивные зоны МАЛТ, где происходит антигензависимый этап развития В-лимфоцитов, так и выраженных цитопенических реакций. Также отмечены изменения со стороны иммуноглобулинов вторичного иммунного ответа (IgG) и основных субклассов G1 и G2, локальный уровень которых закономерно повышается в ответ на опухолевый процесс. Снижение концентрации иммуноглобулинов G, G1, G2, в секрете обнаружено в группе пациентов после ХЛТ. Концентрация иммуноглобулинов G3 и G4 субклассов не имела различий среди изучаемых групп.

Таким образом, применение в терапии сопровождения иммуномодулятора Полиоксидония показало его нормализующее влияние на факторы врожденного иммунитета, т.к. значения изучаемых показателей были

сопоставимы с показателями контрольной группы, в отличие от группы после ХЛТ. Мукозальные иммуномодулирующие эффекты препарата определяются его влиянием на клеточные механизмы врожденного иммунитета, антителообразование, процессы детоксикации. Кроме того, выраженная анти-токсическая активность препарата, связанная с его высокомолекулярной природой и высокой сорбционной способностью, позволяет широко применять иммуномодулятор Полиоксидоний в качестве терапии сопровождения ХЛТ плоскоклеточного рака СОПР, что наряду с выраженным иммуномодулирующим эффектом способствует профилактике развития лучевых мукозитов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Проценко С. А. // *Практ. онкол.* – 2007. – Т. 8, – С. 173-181.
2. *Иммунотерапия при злокачественных новообразованиях* / В. И. Новиков, В. И. Карандашов, И. Г. Сидорович. – М.: Медицина, 2002. – 160 с.

### MUCOSAL EFFECTS OF POLYOXIDONIUM SUPPORT CHEMORADIATION THERAPY OF SQUAMOUS CELL CARCINOMA OF OROFACIAL AREA

Altman E. V.

*Medical University of South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russia*

The use of immunomodulator Polyoxidonium in the chemoradiation support treatment of the oral mucosa cancer showed its normalizing effect on the protective factors of innate immunity, antibody production, detoxification processes. Pronounced antitoxic activity of the drug associated with its high molecular nature and high sorption capacity, well suited for the use of immunomodulator Polyoxidonium in the treatment of cancer orofacial area that along with a strong immunomodulatory effect allows preventing the development of radiation mucositis.

*Key words:* cancer of the oral mucosa, Polioksidoniy, mucosal immunity.



## БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ СИНТЕТИЧЕСКИХ СТРУКТУРНЫХ ВАРИАНТОВ ПЕПТИДА СЕМЕЙСТВА КАТЕЛИЦИДИНОВ

Артамонов А. Ю.<sup>1</sup>, Шанин С. Н.<sup>1</sup>, Романовская Е. В.<sup>2</sup>,  
Колодкин Н. И.<sup>3</sup>, Смирнова М. П.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»; <sup>2</sup>Санкт-Петербургский государственный университет; <sup>3</sup>ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

Актуальность представленного исследования определена всемирной проблемой здравоохранения – развитием устойчивости патогенных микроорганизмов к широко используемым типам противобактериальных лекарственных средств. Одним из выходов из сложившейся ситуации является применение антимикробных пептидов (АМП) системы врожденного иммунитета для разработки синтетических препаратов нового поколения с антибактериальными, фунгицидными, противоопухолевыми и иммунокорректирующими свойствами. Изучение антимикробной, гемолитической и цитотоксической активности, влияния на проницаемость мембран *Escherichia coli*, штамм ML-35p синтетических пептидов Ind23, Ind34, Ind35 и Ind36, созданных на основе природного индолицидина (Ind), выявило один из эффективных способов снижения гемолитической активности Ind, при сохранении высокой антимикробной активности. Синтетический пептид Ind36, проявлял наименьшую и гемолитическую, и цитотоксическую активность в отношении исследуемых клеток и является наиболее перспективным для дальнейшего исследования.

**Ключевые слова:** врожденный иммунитет, антимикробные пептиды, резистентность микроорганизмов.

Актуальность проведенного исследования определена всемирной проблемой здравоохранения – развитием устойчивости патогенных микроорганизмов к широко используемым типам противобактериальных лекарственных средств. Европейская организация European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) установила, что в 2013 году в результате антибиотико-устойчивых бактериальных инфекционных заболеваний в Европе погибло 25 000 человек [1].

Проблема преодоления устойчивости патогенных микроорганизмов к применяемым в медицине антимикробным препаратам может быть решена путем создания новых антибиотических и иммуномодулирующих лекарственных средств. С этой точки зрения особый интерес представляют антимикробные пептиды (АМП) системы врожденного иммунитета, которые рассматриваются как перспективная основа для разработки препаратов нового поколения с антибактериальными, фунгицидными, противоопухолевыми и иммунокорректирующими свойствами [2].

Создание различных структурных модификаций природных АМП и анализ их биологической активности позволяет выявить направления оптимизации функциональных свойств этих молекул для практического применения [3].

Целью настоящей работы было изучение антимикробной, гемолитической и цитотоксической активности, влияния на проницаемость мембран *Escherichia coli*, штамм ML-35p синтетических пептидов Ind23, Ind34, Ind35 и Ind36.

**Материалы и методы.** Проведен анализ биологической активности пептидов Ind23 (IL- $\beta$ A-WKW- $\beta$ A-WW- $\beta$ A-WRR-NH<sub>2</sub>), Ind34 (IL-Abu-WKW-Abu-WW-Abu-WRR-NH<sub>2</sub>), Ind35 (IL-Acp-WKW-Acp-WW-Acp-WRR-NH<sub>2</sub>) и Ind36 (IL-Ava-WKW-Ava-WW-Ava-WRR-NH<sub>2</sub>), созданных на основе структуры индолицидина (Ind, ILPWKWPWPWRR-NH<sub>2</sub>) – природного пептида лейкоцитов быка. Остаток пролина в этих аналогах индолицидина заменен на остатки аминокислот, не встречающихся в АМП млекопитающих: бета-аланина ( $\beta$ A),

аминобутировой кислоты (Abu), аминоклопентановой кислоты (Asp), аминвалериановой кислоты (Ava). Перечисленные пептиды получены с помощью твердофазного химического синтеза на основе структур природных пептидов.

В работе использованы микроорганизмы *Escherichia coli*, штамм ML-35p; *Listeria monocytogenes*, штамм EGD; *Staphylococcus aureus*, штамм 710a, которые были предоставлены проф. Р. Лерером (Калифорнийский университет, Лос-Анжелес, США).

**Определение минимальной ингибирующей концентрации (МИК)** пептидов проводили с использованием ресазурина – хромогенного маркера метаболической активности клеток. Пробы инкубировали в течение 2 часа при 37°C в присутствии ресазурина в термостатируемой ячейке спектрофотометра, проводя каждые 10 мин измерение их оптической плотности на длинах волн 570 и 600 нм.

**Влияние пептидов на проницаемость внешней и внутренней мембран *E. coli*, ML-35p** оценивали с помощью хромогенных и флуоресцентных маркеров проницаемости [4] – субстратов для фермента β-лактамазы в периплазматическом пространстве и β-галактозидазы в цитоплазме микроорганизма. В качестве маркеров повышения проницаемости внешней мембраны применяли Nitrocefin (Novabiochem, USA), внутренней – ONPG (Sigma). Оценку изменения проницаемости мембран проводили в режиме реального времени в течение 60 минут.

**Фотометрический метод оценки гемолитической активности** антимикробных пептидов в отношении эритроцитов человека основан на измерении оптической плотности проб, содержащих гемоглобин, вышедший из лизированных эритроцитов, при длине волны 540 нм. Эритроциты человека получали от здоровых доноров 20-30 лет с применением стандартной методики. Клетки инкубировали с пептидами в течение 30 мин при 37 °С.

**Цитотоксическое действие пептидов** исследовали с помощью МТТ-теста, как описано ранее [5]. Пептиды инкубировали с клетками эритромиелоидного лейкоза человека К-562 в течение 24 ч при 37 °С, 5% CO<sub>2</sub> и 100% влажности. Для анализа связи между концентрацией пептида и его цитотоксическим эффектом использован нелинейный регрессионный анализ, определение значения ИК50 (50% ингибирующая концентрация).

**Результаты исследования.** Показано, что синтетические пептиды Ind23 и Ind34 с заменой пролина на βА и Abu, соответственно, более активны, чем природный пептид Ind, в отношении всех исследуемых штаммов микроорганизмов. Были определены следующие значения МИК, мкМ для пептидов Ind23, Ind34, Ind35, Ind36 и Ind в отношении микроорганизмов *E. coli*, ML-35p: 1,25; 1,25; 5,00; 5,00 и 1,25, соответственно; *L. monocytogenes*, EGD: 0,63; 0,31; 1,25; 2,50 и 1,25; и *S. aureus*, 710a: 1,25; 0,63; 1,25; 1,25 и 2,50.

Изучение влияния пептидов Ind23, Ind34, Ind35, Ind36 и Ind на проницаемость мембран *E. coli* ML-35p для хромогенных маркеров выявило, что все исследованные пептиды увеличивают проницаемость как внешней, так и внутренней мембраны *E. coli* ML-35p.

При исследовании эффектов синтетических пептидов Ind23, Ind34, Ind35 и Ind36 на эритроциты человека показано, что все изученные пептиды обладают слабо выраженной гемолитической активностью. При действии этих пептидов в концентрации 100 мкМ лизису подвергалось 13; 15; 13 и 11% клеток, соответственно, в то время как для природного Ind гемолиз эритроцитов достигал 30%.

Цитотоксичность пептидов Ind23, Ind34, Ind35, Ind36 и Ind, в отношении клеток эритромиелоидного лейкоза человека К-562 оценена по величине ИК50, которая для перечисленных выше пептидов составила 3,7; 2,6; 5,6 и 5,8 мкМ, соответственно, по сравнению 3,1 мкМ для индолицидина.

Встраивание рассматриваемых в работе остатков аминокислот в молекулу природного пептида индолицидина выявило один из эффективных способов снижения гемолитической активности этого пептида, при этом все изученные в работе синтетические пептиды сохранили высокую антимикробную активность. Синтетический пептид Ind36, у которого остаток пролина заменен на остаток аминвалериановой кислоты, проявил наименьшую гемолитическую и цитотоксическую активность в отношении исследуемых клеток.

Работа поддержана грантом РФФИ № 13-04-02102а и «Программой «Протеом человека».

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Weist K., Diaz Högberg L. // Euro Surveill. – 2014. – Vol. 19. – N. 46. – pii=20962.

2. Артамонов А. Ю., Рыбакина Е. Г., Орлов Д. С., Корнева Е. А. // Вестник СПбГУ.–2014.– Сер. 11, № 1. С. 5–25.
3. Артамонов А. Ю., Шамова О. В., Кокряков В. Н., Миргородская О. А., Орлов Д. С. // Вестник СПбГУ.– 2008.– Сер. 3, № 3.– С. 80-86.
4. Артамонов А. Ю., Шамова О. В., Кокряков В. Н., Орлов Д. С. // Вестник СПбГУ.–2008.– Сер. 3, № 2.– С. 139-142.
5. Шамова О. В., Сакута Г. А., Орлов Д. С. и др. // Цитология.– 2007.– Том 49, № 12.– С. 1000-1010.

## BIOLOGICAL ACTIVITY OF SYNTHETIC STRUCTURAL ANALOGUES OF PEPTIDE FROM THE CATHELICIDIN FAMILY

Artamonov A. Yu.<sup>1</sup>, Shanin S. N.<sup>1</sup>, Romanovskaya E. V.<sup>2</sup>,  
Kolodkin N. I.<sup>3</sup>, Smirnova M. P.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Institute of Experimental Medicine; <sup>2</sup>Saint-Petersburg State University; <sup>3</sup>State Research Institute of Highly Pure Biopreparations of the Federal Medical Biological Agency of Russia, Saint-Petersburg, Russia

Antimicrobial resistance is one of the most serious problems of a healthcare. Cathelicidins, such as indolicidin (Ind) – a peptide from bovine leukocytes – serve as prototypes for inventing of novel synthetic antimicrobial, antifungal, antitumor and immunomodulatory drugs. The current study is dedicated to the investigation of the antimicrobial, hemolytic and cytotoxic activity of synthetic structural analogues of Ind: Ind23, Ind34, Ind35 and Ind36 against eukaryotic cells. All of the studied synthetic peptides demonstrate a weak hemolytic effect against human erythrocytes and are the potent antimicrobial agents. Peptide Ind36, possessing the lowest hemolytic and cytotoxic effects towards human cells is a promising substance for further detailed analysis directed to the design of new drugs.

*Key words:* innate immunity, antimicrobial peptides, antimicrobial resistance.

## ФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ КОРРЕКЦИЯ ИММУННЫХ НАРУШЕНИЙ У ПАЦИЕНТОВ С ЭССЕНЦИАЛЬНОЙ АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТОНИЕЙ II СТАДИИ

Гаврилюк Е. В.

*ГБОУ ВПО Курский государственный медицинский университет, Курск, Россия*

У пациентов эссенциальной артериальной гипертонией II стадии определены изменения уровня провоспалительных и противовоспалительных цитокинов, компонентов системы комплемента и иммуноглобулинов в плазме крови до и после стандартного лечения. Разработан фармакологический способ коррекции нарушений иммунного статуса у пациентов эссенциальной артериальной гипертонией II стадии с использованием «Мексикора» и «Дерината».

*Ключевые слова:* эссенциальная артериальная гипертония, иммунный статус, иммуно-реабилитация.

**Актуальность.** Одной из причин гипертрофии миокарда при гипертонической болезни являются катехоламины («гормоны гипертрофии»), инсулин, соматотропный гормон, фактор роста тромбоцитов, инсулиноподобный фактор роста. Кроме того, важное место в современной нейроэндокринной теории

развития ремоделирования сердца играют про- и противовоспалительные цитокины [4]. Провоспалительные цитокины в норме играют фундаментальную физиологическую роль в иммунорегуляции, но в некоторых случаях способны оказывать патологическое действие, принимая участие в развитии и прогресси-

вании воспаления, микрососудистой гиперкоагуляции, гемодинамических нарушений и метаболического истощения при различных заболеваниях человека как инфекционной, так и не инфекционной природы [1, 3, 5]. Глубокое понимание роли иммунной системы в патогенезе артериальной гипертонии позволит предложить новые подходы к разработке и получению лекарственных препаратов, в основе которых лежат биологические соединения природного происхождения, обладающие свойствами регуляторов иммунитета и обменных процессов организма, в частности, цитокинов [2, 4].

**Цель работы.** Установить изменения уровня цитокинов, компонентов системы комплемента и иммуноглобулинов в плазме крови пациентов с эссенциальной артериальной гипертонией II стадии и разработать фармакологический способ коррекции выявленных нарушений.

**Используемые методы.** В работе представлены данные обследования и лечения на базе ОБУЗ «Городская клиническая больница скорой медицинской помощи» г. Курска 46 пациентов с верифицированным, согласно рекомендациям ВОЗ/МОГ (2013), диагнозом эссенциальная артериальная гипертония III стадии, основанном на данных комплекса клинико-инструментальных методов обследования.

Критериями включения больных в исследование были больные:

- с верифицированным диагнозом эссенциальная артериальная гипертония III стадии;
- в возрасте 20-40 лет;
- с тяжестью состояния не выше средней степени тяжести;
- без или с сопутствующей соматической патологией в стадии полной ремиссии;
- получавшие стандартную терапию;
- с добровольным информированным согласием пациентов на проведение исследования.

Всем пациентам проводилась стандартная терапия: иАПФ (эналаприл), диуретик (гидрохлоротиазид),  $\beta$ -блокатор (бисопролол). При этом 14 пациентов в сочетании со стандартной фармакотерапией получали «Мексикор» (400 мг/сут внутрь 1 мес.) и «Галавит» (100 мг внутримышечно через 24 часа № 10), а 13 пациентов – «Мексикор» и «Деринат» (1,5% – 5,0 внутримышечно через 24 часа № 10).

Количественная оценка уровней ФНО $\alpha$ , ИЛ-1 $\alpha$ , ИЛ-6, ИЛ-2, ИЛ-8, ИЛ-10, рецепторного антагониста ИЛ-1 $\alpha$ , неоптерина, С3, С4, С3а, С5, С5а-компонентов системы комплемента, фактора Н и С1-ингибитора, IgM, IgG, IgA проводилась с помощью тест-систем (ООО «Цитокин», г. Санкт-Петербург) методом твердофазного иммуноферментного анализа на первые сутки и через 30 дней.

Статистическую обработку результатов исследования проводили, используя непараметрические методы. Статистически значимыми считали различия с  $p < 0,05$ .

**Основные результаты.** У пациентов с ЭАГ на момент поступления в стационар в плазме крови выявлено повышение концентрации провоспалительных (ФНО, ИЛ-1 $\alpha$ , ИЛ-6, ИЛ-8) и противовоспалительных цитокинов (ИЛ-10, РАИЛ) и ИЛ-2.

Назначение стандартного лечения у данной категории пациентов позволило к моменту выписки из стационара снизить, но не до уровня нормы, уровень ИЛ-1 $\alpha$ , ИЛ-8, ИЛ-10 и РАИЛ.

При поступлении в клинику у пациентов с ЭАГ в плазме крови выявлено снижение уровня С3-компонента системы комплемента, повышение концентрации С3а, С4, С5, С5а-компонентов системы комплемента, регуляторов системы комплемента (фактор Н и С1-инг.), снижение концентрации иммуноглобулинов класса М и G.

Применение стандартного лечения у данной категории пациентов к моменту выписки из стационара снизило еще в большей степени уровень IgM, нормализовало концентрацию С4, не влияя на остальные измененные показатели системы комплемента.

Использование «Галавита» и «Мексикора» у пациентов с ЭАГ по сравнению со стандартной фармакотерапией нормализует концентрацию IgG, приближает к показателям доноров уровень ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-10 и РАИЛ, повышает содержание ИЛ-2, С5а и IgM, снижает С4-компонент комплемента.

Назначение больным ЭАГ дополнительно к стандартной фармакотерапии «Дерината» и «Мексикора» позволило в отличие от предыдущих групп больных, нормализовать уровень ИЛ-1 $\alpha$ , ИЛ-8, С3, С3а, С4, С5-компонентов системы комплемента, С1-ингибитора, IgM и IgG, скорректировать, но не до уровня нормы, концентрацию ФНО, ИЛ-6, ИЛ-10, ИЛ-2, С5а и IgA.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гаврилюк В. П., Гаврилюк Е. В. // Российский аллергологический журнал. – 2010. – Т. 5, № 1. – С. 69.
2. Гаврилюк Е. В., Конопля А. И., Михин В. П. // Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье». – 2008. – № 2. – С. 109-115.
3. Гаврилюк Е. В., Михин В. П., Быстрова Н. А., Суслова Ю. И. // Системный анализ и управление в биомедицинских системах. – 2013. – Т. 12, № 4. – С. 1149-1152.
4. Куликов В. Е., Хапман М. Э. // Вестник Санкт-Петербургской государственной медицинской академии им. И. И. Мечникова. – 2009. – № 1 (30). – С. 93-96.
5. Мансимова О. В., Гаврилюк Е. В., Конопля Е. Н. // Системный анализ и управление в биомедицинских системах. – 2010. – Т. 9, № 1. – С. 191-194.

**PHARMACOLOGICAL CORRECTION OF IMMUNE  
DISTURBANCES IN PATIENTS WITH THE ESSENTIAL  
ARTERIAL II STAGE HYPERTENSION**

**Gavrilyuk E. V.**

*Kursk State Medical University, Kursk, Russia*

The changes in the level of proinflammatory and antiinflammatory cytokines, components of system of a complement and immunoglobulins in a blood plasma were determined in patients with the essential arterial II stage hypertension before and after the standard treatment. The pharmacological method of correction of disturbances of the immune status in patients with an such a hypertension was developed using «Mexicor» and «Derinat» as additional to conventional therapy.

*Key words:* essential arterial hypertension, immune status, immunorehabilitation.

**КОРРЕКЦИЯ ИММУННЫХ НАРУШЕНИЙ НА  
СИСТЕМНОМ И МЕСТНОМ УРОВНЕ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ  
ПЕРИОДОНТИТЕ В СТАДИИ ОБОСТРЕНИЯ**

**Голдобин Д. Д., Локтионов А. Л., Конопля А. И.,  
Лазарев А. И.**

*ГБОУ ВПО Курский государственный медицинский университет, Курск, Россия*

До начала лечения в плазме крови пациентов с хроническим периодонтитом в стадии обострения, в большей степени на локальном уровне в слюне, установлена провоспалительная направленность изменений в системах цитокинов и комплемента, недостаточно эффективно компенсируемых стандартным лечением. По возрастанию степени корригирующих эффектов в отношении иммунных нарушений, дополнительно введенные в комплексное лечение периодонтита фармакологические препараты расположились в следующей последовательности: Гепон → Вобэнзим → Гепон + Эссенциале форте Н → Вобэнзим + Эссенциале форте Н.

*Ключевые слова:* иммунные нарушения, хронический периодонтит.

**Актуальность.** Хронический периодонтит относят к числу наиболее распространенных видов патологии периодонта, так как это заболевание занимает третье место среди часто встречающихся стоматологических патологий и нередко приводит к удалению зубов [4]. Вероятность развития и прогрессирующего течения хронического периодонтита во многом определяется состоянием общих и местных факторов иммунной си-

стемы, при этом обнаруживаемые изменения не только затрудняют, но и негативно сказываются на результатах эндодонтического лечения [2]. Результаты современных исследований указывают на необходимость изучения системы цитокинов и комплемента при различных заболеваниях, поскольку они являются наиболее важными интегрирующими и регуляторными факторами иммунной системы, в этой связи фармакологическая коррекция нарушений в этих системах позволит нормализовать функционирование всей иммунной системы [1, 3].

**Цель работы.** Оценка иммунокорректирующих эффектов на системном и местном уровнях иммуномодуляторов и мембранопротекторов при хроническом периодонтите.

**Используемые методы.** Под постоянным наблюдением в клинике ЗАО ГК Медси находилось 67 пациентов обоего пола в возрасте 20-40 лет с клиническими признаками хронического периодонтита в стадии обострения: ноющая боль постоянного характера, отек переходной складки в области причинного зуба, выявление признаков его невозможного терапевтического лечения. При визуальном и инструментальном дополнительном обследовании выявлено наличие воспалительного процесса на верхушке зуба со значительным разрушением костной ткани. Все больные были разделены на 5 групп по 12-15 пациентов в каждой: 1-я группа получала стандартное лечение (удаление причинного зуба, цифран, бифиформ, супрастин), больные 2-й группы дополнительно получали Гепон (10 мг, перорально, через 24 часа, № 30), 3-я – сочетание Гепона и Эссенциале форте Н (по 2 капс., перорально, через 6 часов, № 90), 4-я – Вобэнзим (3 таб., перорально, через 6 часов, № 90), 5-я – Вобэнзим и Эссенциале форте Н. Контрольная группа включала 15 здоровых доноров того же возраста. До и после лечения в плазме крови и слюне при помощи наборов для ИФА определяли концентрацию цитокинов (ФНО, ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-8, ИЛ-4, ИЛ-10, ИЛ-2), рецепторного антагониста ИЛ-1 (РАИЛ), компонентов системы комплемента (С3, С4, С5) и ее регуляторов (С1-ингибитор и фактор Н).

**Основные результаты.** До начала лечения в плазме крови установлено повыше-

ние содержания ФНО, ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-8, С3, С4, С5-компонентов системы комплемента и ее регуляторов (С1-ингибитора и фактора Н), снижение уровня ИЛ-4 и ИЛ-10 при нормальной концентрации РАИЛ. В слюне отмечалось более существенное повышение концентрации ФНО, ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-8, РАИЛ, нормальный уровень ИЛ-4 и ИЛ-10. Стандартное лечение на системном уровне корректировало, но не до показателей доноров, концентрацию ФНО, ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-2, С3-компонента комплемента, повышало содержание ИЛ-10 и РАИЛ, а на местном уровне – корректировало уровень ФНО, ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-8, ИЛ-2, повышало концентрацию ИЛ-10 и РАИЛ, не влияя на показатели системы комплемента. Дополнительное введение в схему лечения Гепона или Вобэнзима в равной степени корректировало показатели системы цитокинов и комплемента. Совместное применение Гепона и Эссенциале форте Н системно и локально соответственно нормализовало 8,3% и 16,6% показателей и корректировало 75% и 67%. Введение комбинации Вобэнзима и Эссенциале форте Н нормализовало и корректировало 66,7% и 33,3% показателей на системном уровне, на местном – 41,7% и 58,3%.

Таким образом, у больных с хроническим периодонтитом в стадии обострения имеются системные и местные изменения показателей иммунного статуса. По возрастанию степени корректирующих эффектов на иммунные нарушения дополнительно введенные в комплексное лечение периодонтита препараты расположились в следующей последовательности: Гепон  $\rightarrow$  Вобэнзим  $\rightarrow$  Гепон + Эссенциале форте Н  $\rightarrow$  Вобэнзим + Эссенциале форте Н.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гариб Ф. Ю. М.: Издательство Московского университета, 2013. – 48 с.
2. Лунев М. А., Конопля Н. А., Конопля А. И., Локтионов А. Л. Ученые записки Орловского государственного университета (научный журнал). – 2014. – № 7 (63). – С. 68-69.
3. Лунев М. А., Конопля А. И., Локтионов А. Л./ Вестник новых медицинских технологий (электронное издание). – 2013. – № 1.
4. Робустова Т. Г., Митронин А. В. Российский стоматологический журнал. 2007. – № 1. – С. 38-41.

## CORRECTION OF IMMUNE DISTURBANCES AT THE SYSTEMIC AND LOCAL LEVEL AT THE CHRONIC PERIODONTITIS IN THE EXACERBATION STAGE

Goldobin D. D., Loktionov A. L., Konoplya A. I., Lazarev A. I.

*Kursk State Medical University, Kursk, Russia*

Before treatment in a blood plasma of patients with a chronic periodontitis in an exacerbation stage, more at the local level in saliva, the pro-inflammatory orientation of changes in systems of the cytokines and a complement which insufficiently are effectively compensated by standard treatment is established. By ascending of degree of corrective effects against immune disturbances, the pharmacological drugs which are additionally injected in complex treatment of a periodontitis are located in the following sequence: Gepon → Vobenzim → Gepon + Essentiale Forte N → Vobenzim + Essentiale Forte N.

*Keywords:* immunity disturbances, chronic periodontitis.

---

---

## ИММУНОСТИМУЛИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ ЭКСТРАКТА *COLURIA GEOIDES (ROSACEAE)* ПРИ ГЕНЕРАЛИЗОВАННОЙ СТАФИЛОКОККОВОЙ ИНФЕКЦИИ

Дутова С. В.<sup>1</sup>, Неделькина Н. П.<sup>1</sup>, Карпова М. Р.<sup>2</sup>,  
Чумаков В. Ю.<sup>1</sup>, Мяделец М. А.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>ФГБОУ ВПО «Хакасский гос. университет им. Н. Ф. Катанова», Абакан;

<sup>2</sup>ГБОУ ВПО Сибирский гос. медицинский университет Минздрава России, Томск;

<sup>3</sup>ФГБУН Центральный сибирский ботанический сад СО РАН, Новосибирск, Россия

На модели генерализованной стафилококковой инфекции у аутбредных мышей исследованы иммуностимулирующие свойства экстракта *Coluria geoides (Rosaceae)*, ранее в эксперименте проявившего антимикробный, иммунокорректирующий и иммуностимулирующий эффекты. В дозе 50 мг/кг при лечебном (после заражения) курсовом введении исследуемый экстракт достоверно стимулировал фагоцитоз в инкубационном периоде и на стадии выздоровления; при профилактическом курсе (до заражения) – в разгар инфекционного процесса и на стадии выздоровления. Применение экстракта *C. geoides* приводило к достоверной стимуляции синтеза специфических антител-агглютининов, особенно на 3–5 сутки инфекционного процесса.

*Ключевые слова:* стафилококковая инфекция, фагоцитарная активность, *Coluria geoides*.

Антимикробные свойства у биологически активных веществ растительного происхождения часто сочетаются с иммуностимулирующими [1]. Такая комбинация фармакологических эффектов актуальна при лечении гнойно-воспалительных процессов, как правило, сопровождающихся иммунодефицитами [2]. Перспективным источником иммунотропных препаратов с антимикробным эффектом является эфирномасличное растение *Coluria geoides* (Pall.) Ledeb. (*Rosaceae*), экстракт которого

в эксперименте проявил выраженное антимикробное, иммунокорректирующее и иммуномодулирующее действие.

Целью настоящего исследования явилась оценка иммуностимулирующего действия экстракта из сырья *C. geoides* при генерализованной стафилококковой инфекции.

Исследование проводили на трех группах (по 65 особей) белых аутбредных мышей обоего пола весом 18–20 граммов в соответствии с международными этическими и научными

стандартами качества проведения исследований на животных. Стафилококковую инфекцию моделировали однократным внутрибрюшинным введением взвеси *S. aureus* 209P в  $\frac{1}{2}$  от экспериментально установленной нами LD<sub>50</sub> (1 млрд. клеток). Стандартизацию бактериальной взвеси проводили с помощью денситометра DEN-1B. Исследуемый препарат получали из воздушно-сухого сырья *C. geoides* методом перколяции 40%-ным спиртом этиловым, высушивали при температуре 25–30°C, стандартизовали по содержанию экстрактивных веществ. Экстракт вводили животным в желудок в виде раствора в дистиллированной воде в дозе 50 мг/кг в течение 5 дней, начиная со дня заражения (1-я экспериментальная группа) и в течение 5 дней непосредственно до заражения (2-я экспериментальная группа). Забор материала (образцов крови) осуществляли периодически в ходе инфекционного процесса (на 2, 3, 5, 7, 10, 15, 20, 25 день после заражения). Исследование влияния экстракта на фагоцитарную активность проводили при инкубации образцов крови с суспензией латекса, титр специфических антител определяли в реакции агглютинации на предметных стеклах с суточной бульонной культурой возбудителя. Полученные результаты обрабатывали с использованием пакета программ IBM SPSS Statistics 19, результаты представляли в виде медианы и интерквартильного размаха. Независимые группы сравнивали с помощью непараметрического U-теста Манна-Уитни, различия считали достоверными при  $p < 0,05$ .

При однократном внутрибрюшинном заражении культурой *S. aureus* на 2 день у мышей наблюдали развитие генерализованной стафилококковой инфекции с отчетливыми проявлениями клинических признаков заболевания. На 2 день наблюдения 24,8% животных контрольной группы погибло, в 1-й и 2-й экспериментальных группах выживаемость составила 100%. Возбудитель определялся в организме животных контрольной группы до 25 дня наблюдения включительно, в экспериментальных группах – до 20 дня, дольше всего были инфицированы почки.

Фагоцитарная активность нейтрофилов в образцах крови животных контрольной группы колебалась в пределах 13,5–38,0%, минимальный показатель регистрировали на 7 день инфекционного процесса, максимальный – на 15 день. Фагоцитарный индекс

(по результатам параллельно проведенных исследований) у интактных аутбредных мышей составлял 25,50 (21,25÷31,50)%. Фагоцитарная активность нейтрофилов животных 1-й экспериментальной группы, получавших исследуемый экстракт лечебным курсом, была достоверно ( $p=0,002-0,04$ ) выше аналогичных показателей контрольных мышей в начале и в конце инфекционного процесса (на 2, 5 и 15-25 сутки), в период с 7 по 10 сутки отличалась незначительно. Максимальный фагоцитарный индекс был зарегистрирован на 15 сутки инфекции – 69,0 (48,0÷79,0)%. У животных 2-й экспериментальной группы, получавших экстракт *C. geoides* профилактическим курсом, фагоцитарный индекс достоверно ( $p=0,000-0,01$ ) превышал контрольные показатели в разгар инфекционного процесса (с 5 по 10 сутки) и на стадии выздоровления (20-25 сутки). Максимального значения – 55,5 (48,3÷74,5)% – активность фагоцитоза достигала на 10 сутки инфекции.

Фагоцитарное число в образцах крови мышей контрольной группы колебалось незначительно в пределах 1,1–2,3 частиц латекса/нейтрофил, плавно увеличиваясь к 10-м суткам исследования и снижаясь в периоде выздоровления. У животных 1-й экспериментальной группы интенсивность фагоцитоза была достоверно выше, чем у животных контрольной группы на 2 и 5 сутки инфекции и в период выздоровления (15-25 сутки). Максимального значения этот показатель достигал на 15 сутки: 12,5 (6,7÷15,6) частиц латекса/нейтрофил. В образцах крови мышей 2-й экспериментальной группы фагоцитарное число достоверно превышало значения контроля на 7, 10, 20 и 25 сутки инфекционного процесса, достигая максимального значения (7,4 (6,2÷12,0) частиц латекса/нейтрофил) в конце периода выздоровления.

Специфические антитела к *S. aureus* появлялись в цельной сыворотке крови животных контрольной группы на 5 сутки инфекционного процесса, затем их титр постепенно нарастал и на 25 сутки Ig<sub>2</sub>T составил 13,7. У животных 2-й экспериментальной группы антитела появились также в цельной сыворотке на 5 сутки, но на всем протяжении эксперимента их титр превышал показатели контроля. У животных 1-й экспериментальной группы специфические антитела были обнаружены в цельной сыворотке на 3 сутки после зараже-



ния, на 5 сутки их титр составил 1:2 и далее на всем протяжении инфекционного процесса был достоверно ( $p=0,001-0,03$ ) выше показателей животных контрольной группы.

Большинство стафилококковых инфекций являются эндогенными и связаны с попаданием бактерий на травмированные поверхности [3]. Поэтому важная роль в защите макроорганизма от стафилококковой инфекции принадлежит нейтрофилам, поглощающим и уничтожающим бактериальные клетки еще в начале инфекционного процесса, на этапе колонизации, что подтверждено экспериментально [4]. Исследуемый экстракт при лечебном курсовом введении достоверно активизировал способность нейтрофилов периферической крови к фагоцитозу в течение инкубационного периода и в начале разгара инфекции, что, по-видимому, привело к снижению колонизации тканей животных стафилококками и увеличению выживаемости. Профилактическое курсовое введение экстракта *C. geoides* стимулировало фагоцитоз в разгар инфекционного процесса и на стадии выздоровления, что приводило к ускорению элиминации возбудителя из организма животных.

Стимуляция экстрактом синтеза специфических антител-агглютининов имеет большое значение в процессе реализации иммунного ответа, так как опсонизация антителами бактериальных клеток приводит к значительной активации фагоцитоза стафилококков [5].

Следовательно, экстракт *C. geoides* оказывает иммуностимулирующее действие при генерализованной стафилококковой инфекции. Использование изучаемого фитопрепарата возможно не только для лечения, но и в целях профилактики.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Куркин В. А., Запесочная Г. Г., Авдеева Е. В., Ежков В. Н. Фенилпропаноиды лекарственных растений. Самара: ООО «Офорт», ГОУ ВПО «СамГМУ», 2005, 426-428.
2. Балыкова Л. А. Практическая медицина, 2010, 45, 137-140.
3. Пономаренко С. В. *Annals of Mechnicov Institute*, 2013, 3, 13-16.
4. Mölne, L., Verdrengh M., Tarkowski A. *Infection and immunity* 2000, 1, 68 (11). 6162-6167.
5. Слободчикова С. В., Шмагель К. В., Николаева А. М. Российский иммунологический журнал, 2011, 3-4, 266-273.

### IMMUNOSTIMULATORY EFFECT OF EXTRACTS OF COLURIA GEOIDES (ROSACEAE) IN GENERALIZED STAPH INFECTION

<sup>1</sup>Dutova S.V., <sup>1</sup>Nedelkina N.P., <sup>2</sup>Karpova M.R.,  
<sup>1</sup>Chumakov V.Y., <sup>3</sup>Mjadelets M.A.

<sup>1</sup>FGBOU VPO «Khakass state University n. a. N. F. Katanov», Abakan; <sup>2</sup>GBOU VPO Siberian state medical University of the Ministry of health of Russia, Tomsk; <sup>3</sup>FGBUN Central Siberian botanical garden of the Siberian Branch of the Russian Academy of Science, Novosibirsk, Russia

On the model of generalized staph infection in inbred mice investigated the immunostimulatory properties of the extract of *Coluria geoides* (Rosaceae), earlier in the experiment who showed antimicrobial, immunocorrecting and immunostimulating effects. At a dose of 50 mg / kg at the medical (after infection) Exchange administration of the test extract significantly stimulated phagocytosis in the incubation period and at the stage of recovery; for prophylactic course (before infection) – at the height of the infection process and at the stage of recovery. Application *C. geoides* extract resulted in a significant stimulation of the synthesis of specific antibodies-agglutinins especially for 3-5 days of infection.

*Key words:* staphylococcal infection, phagocytic activity, *Coluria geoides*.

## TLR9 – ОПОСРЕДОВАННЫЕ МЕХАНИЗМЫ ИММУНОТРОПНЫХ ЭФФЕКТОВ ДЕРИНАТА ПРИ ДЕФЕКТАХ ФАГОЦИТАРНОЙ И МИКРОБИЦИДНОЙ ФУНКЦИИ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ

Колесникова Н. В., Нестерова И. В., Каплина Э. Н.,  
Чудилова Г. А., Ломтатидзе Л. В., Русинова Т. В.,  
Ковалева С. В., Сторожук С. В.

ГБОУ ВПО «Кубанский государственный медицинский университет»  
Минздрава России, Краснодар, Россия

Исследованиями *in vitro* показано, что в условиях предварительной блокады TLR9-рецепторов в нейтрофильных гранулоцитах антагонистом TLR9 – ODN-TTAGGG, полученные ранее иммунотропные эффекты дерината в отношении показателей фагоцитарной и микробицидной функции НГ здоровых лиц и больных инфекционным мононуклеозом и острым бактериальным тонзиллитом нивелируются и соответствуют исходным. Это позволяет считать, что одним из возможных механизмов иммунотропных эффектов дерината в отношении функциональной активности НГ как в норме, так и при инфекционных заболеваниях вирусной и бактериальной этиологии механизм, связанный с активацией TLR9.

*Ключевые слова:* толл-рецепторы, нейтрофильные гранулоциты, механизмы, деринат.

В настоящее время известно, что входящие в состав ДНК метилированные динуклеотиды, (иммуностимулирующие мотивы CpG-ДНК), определяют способность ДНК как эукариот, так и прокариот активировать врожденный и адаптивный иммунитет [Олишевский С.В., Шляховенко М. А., Козак В. В. и соавт., 2006; Пак В. Г., Сергеев И. В., Трофимов Д. Ю. и соавт., 2004]. Так известные гомопоэтические и иммунотропные эффекты натриевой соли олигомеров ДНК, выделенной из молок осетровых рыб (дерината) [Каплина Э.Н., Вайнберг Ю. П., 2005], связывают с взаимодействием нуклеотидов с пуриновыми рецепторами клеток микроокружения и периферической крови [Серебряная Н.Б., 2010]. Поскольку распознавание CpG-мотивов иммунной системой происходит путем их взаимодействия с толл-подобным рецептором 9 типа (TLR9), и с последующей активацией врожденного и приобретенного иммунитета [Goldfarb Y. et al., 2011], целью настоящего исследования явилась оценка *in vitro* иммунотропных эффектов дерината на фагоцитарную и микробицидную функцию нейтрофильных гранулоцитов (НГ) в норме и при инфекционных заболеваниях, в том числе, в условиях предварительной бло-

кады TLR9, что позволит решить вопрос о возможности TLR9-опосредованного механизма действия дерината на НГ.

Для реализации указанной цели цельную кровь здоровых добровольцев и пациентов с инфекционным мононуклеозом, ассоциированным с Эпштейн-Барр-вирусной инфекцией (ВЭБ-ИМ) и с острым бактериальным тонзиллитом (ОБТ) инкубировали в условиях CO<sub>2</sub>-инкубатора «New Brunswick Scientific Galaxy 170S@ (Великобритания)» 30 минут при температуре 37 °С с синтетическим антагонистом TLR9 – ODN-TTAGGG («Invitrogen» LifeTechnologies, США, 5 мкл/мл крови), а затем в течение 30 минут при 37 °С – с 1,5%-ным раствором дерината (ЗАО «Фармацевтическое предприятие «Техномедсервис»). Оценку фагоцитарной функции НГ проводили по числу активных фагоцитов (%ФАН), их поглотительной (ФЧ, ФИ) и переваривающей (%П, ИП, ИППА) способности; исследование оксидантной биоцидности НГ осуществляли в спонтанном и стимулированном NBT-тесте, определяя соответствующие показатели (%ФПК, СЦИ, КМ).

Исследованиями выявлено достоверное возрастание %ФАН при вирусной инфекции,

и его снижение – при бактериальной инфекции. При этом угнетение поглотительной способности НГ имело место лишь при ОБТ, а незавершенность фагоцитарного акта была выявлена как при вирусной, так и при бактериальной инфекции. Наряду с этим, у пациентов с ОБТ в спонтанном тесте %ФПК достоверно выше, чем в спонтанном, что вызвало снижение величины КМ в 4 раза. Между тем при ВЭБ-ИМ отмечено менее выраженное, чем при ОБТ, снижение стимулированного %ФПК, что сопровождалось лишь двукратным снижением величины КМ.

В то время как деринат *in vitro* не оказывает влияния на показатели фагоцитарной функции НГ у здоровых лиц, при инкубации с ним цельной крови больных ВЭБ-ИМ наблюдалось достоверное снижение исходно высокого %ФАН, а при ОБТ – существенное возрастание исходно низкого %ФАН. В то же время у больных с ОБТ обнаружена вызванная деринатом модуляция поглотительной и переваривающей способности. Наряду с этим, выявлены позитивные иммуностропные эффекты дерината в виде усиления (у условно здоровых лиц) и восстановления (у больных с инфекционным процессом) адекватности реагирования оксидазных микробицидных систем НГ на нагрузку антигеном в условиях *in vitro*.

Изучение эффектов дерината в системе *in vitro* в условиях предварительной блокады TLR9 антагонистом ODN-TTAGGG, показало, что выявленные ранее его иммуностропные эффекты в отношении НГ здоровых лиц, а также при дефектах фагоцитарной и микробицидной функции НГ пациентов с ВЭБ-ИМ и ОБТ

полностью нивелируются и соответствуют исходным. В частности, если инкубация цельной крови больных ВЭБ-ИМ с деринатом приводит к достоверному снижению исходно высокого уровня содержания клеток, способных к активному фагоцитозу, то при блокаде TLR9 данный показатель соответствует исходному. Сходные эффекты выявлены и в отношении поглотительной способности НГ (ФИ) и их переваривающей способности (%П) при инкубации цельной крови больных инфекционным мононуклеозом с деринатом. При изучении влияния дерината на показатели кислород-зависимого метаболизма НГ в условиях экспериментальной блокады TLR9 была также выявлена отмена большинства иммуностропных эффектов, индуцированных деринатом. Это позволяет считать одним из возможных механизмов иммуностропных эффектов дерината в отношении функциональной активности НГ как в норме, так и при инфекционных заболеваниях вирусной и бактериальной этиологии механизм, связанный с активацией TLR9.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Каплина Э. Н., Вайнберг Ю. П. Деринат – природный иммуномодулятор для детей и взрослых. – М., 2005.
2. Олишевский С. В., Шляховенко М. А., Козак В. В. и соавт. // Онкология, 2006. – т. 8, № 2. – С. 209-217.
3. Пак В. Г., Сергеев И. В., Трофимов Д. Ю. и др. // Rus. J. Immunol. 2004. – Vol. 9. – P. 20.
4. Серебряная Н. Б. // Иммунология, 2010. – № 5. – С. 273-281.
5. Goldfarb Y. et al. // Brain, Behavior and Immunity – 2011. – Vol. 25. – P. 67-76.

#### TLR9 – MEDIATED MECHANISMS IMMUNOTROPIC EFFECTS OF DERINAT FOR DEFECTS PHAGOCYtic AND FUNCTIONS MICROBICIDAL NEUTROPHILIC GRANULOCYTES

Kolesnikova N. V., Nesterova I. V., Kaplina E. N.,  
Chudilova G. A., Lomtadze L. V., Rusinova T. V.,  
Kovaleva S. V., Storozhuk S. V.

Medical University "KSMU" Ministry of Health of Russia, Krasnodar, Russia

*In vitro* studies have shown that, in the pre-blockade TLR9-receptor antagonist of neutrophilic granulocytes (NG) TLR9 – ODN-TTAGGG previously obtained immunotropic effects of derinat on indicators of phagocytic and microbicidal function NG healthy subjects and patients with infectious mononucleosis and acute bacterial tonsillitis leveled and match the original. This suggests that one possible mechanism immunotropic effects of derinat in relation to the functional activity of NG as normal, and infectious diseases of viral and bacterial etiology mechanism associated with the activation of TLR9.

## ПОЛИОКСИДОНИЙ В РЕАБИЛИТАЦИИ БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ПИЕЛОНЕФРИТОМ

Лехмус Т. Ю.<sup>1</sup>, Гермаш Е. И.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ГБОУ ВПО «Башкирский государственный медицинский университет Росздрава»;

<sup>2</sup>ГУЗ РКБ имени Г.Г. Куватова, Уфа, Россия

Статья посвящена изучению иммунной эффективности препарата «Полиоксидоний» в комплексной терапии больных хроническим пиелонефритом.

*Ключевые слова:* полиоксидоний, хронический пиелонефрит, иммунореабилитация, иммунитет.

Инфекции мочевыводящих путей относятся к наиболее распространенным инфекционным заболеваниям, встречающимся в практике врачей различных специальностей. По частоте они уступают лишь инфекциям дыхательных путей. До 50% женщин в течение жизни переносят хотя бы один случай острого цистита или пиелонефрита. Проблема хронического пиелонефрита сохраняет свою актуальность вследствие высокой заболеваемости лиц самого трудоспособного возраста и недостаточной эффективности лечения, в результате чего полная ремиссия наступает редко. Значительные трудовые потери, вследствие частых обострений пиелонефрита, а также преобладание среди больных лиц молодого репродуктивного возраста и особенно женщин, обуславливают социально-экономическую значимость данной проблемы.

Известно, что в основе пиелонефрита лежит инфекционно-воспалительный процесс, протекающий в чашечно-лоханочной системе почки и ее интерстициальной ткани.

В последние годы проводятся исследования иммунологических факторов и обсуждается их значение при пиелонефрите, однако эти данные противоречивы и касаются отдельных сторон иммунитета, причем в активную фазу хронического пиелонефрита, когда затруднена диагностика дефектов иммунного статуса вследствие адаптивной его реакции на воспаление. Наряду с этим является и чрезвычайно актуальным применение иммуномодуляторов в комплексной терапии инфекций мочевыводящих путей, их влияние на различные звенья

иммунологической защиты при хроническом пиелонефрите.

Целью работы явилась оценка эффективности применения иммуномодулятора Полиоксидоний в комплексном лечении больных хроническим пиелонефритом на основе анализа показателей клеточных и гуморальных факторов защиты. Полиоксидоний обладает комплексным действием, начинающимся с активации моноцитарно-макрофагальной системы, нейтрофилов и натуральных киллеров, в дальнейшем, приводящем к последовательной нормализации клеточного и гуморального иммунного ответа. Наличие адьювантных, антиоксидантных и детоксицирующих свойств препарата явилось основанием для включения его в комплексную терапию больных хроническим пиелонефритом.

Исследование иммунитета проведено у 50 больных в возрасте от 20 до 48 лет со средней длительностью заболевания 5,2±1,5 года. Больные хроническим пиелонефритом получали антибактериальную терапию (фторхинолоны) в сочетании с иммуномодулятором Полиоксидоний (внутримышечно 6 мг один раз в сутки в течение 10 дней). Контрольную группу составили 30 практически здоровых лиц.

Всем больным проведено общеклиническое и лабораторное исследование иммунного статуса с включением основных маркеров воспалительного каскада: оценка фагоцитарной функции лейкоцитов по его фагоцитарному числу, фагоцитарному индексу на содержание лейкоцитов, вступивших в фагоцитоз, спонтанному и стимулированному НСТ-

тесту с подсчетом нейтрофилов, восстанавливающих нитросиний тетразолий и индекс его активности; оценка концентрации иммуноглобулинов А, М, G в сыворотке больных, комплементарной активности по 50% гемолизу эритроцитов барана, циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК); идентификация популяций и супопуляций лимфоцитов с помощью моноклональных антител по кластерам дифференцировки: зрелые лимфоциты (CD3), хелперы (CD4), цитотоксические клетки (CD8), естественные киллеры (CD 16), В-лимфоциты (CD 22), активированные лимфоциты (CD25); исследование продукции провоспалительных цитокинов- хемокинов – IL-6, IL-8. Выполнение такого комплекса исследований разноуровневых представителей маркеров воспаления позволяет проследить иммунновоспалительный каскад и последовательность иммунного ответа.

Применение иммуномодулятора Полиоксидоний в комплексной терапии больных хроническим пиелонефритом способствовало более быстрому купированию воспалительного процесса: уже к 7-му дню лечения больные отмечали уменьшение болевого синдрома, общей слабости, снижение симптомов интоксикации и температуры тела.

Мониторинг иммунологических показателей, которые характеризуют состояние неспецифической резистентности, показал, что имело место повышение фагоцитарной активности лейкоцитов, а именно фагоцитарного индекса и фагоцитарного числа. Так фагоцитарный индекс до лечения составлял  $40,8 \pm 2,3\%$ , после лечения –  $51,3 \pm 0,6\%$ ,  $p < 0,001$ , а фагоцитарное число  $4,3 \pm 0,3$  и  $5,6 \pm 0,5$  ( $p < 0,001$ ) соответственно.

Показатели клеточного звена иммунитета: зрелые Т-лимфоциты (CD3), Т-хелперы (CD4) и цитотоксические Т-лимфоциты (CD8) не показали значимых изменений на фоне применения препарата. То же самое касалось и естественных киллеров (CD16).

Результаты исследования гуморального звена иммунитета показали увеличение показателей IgA (до лечения  $1,5 \pm 0,4$  г/л, после лечения –  $3,9 \pm 0,1$  г/л;  $p < 0,001$ ) и IgG (до лечения  $11,9 \pm 0,8$  г/л, после лечения  $13,5 \pm 0,7$  г/л;  $p < 0,01$ ).

Новым аспектом действия препарата было снижение цитокинов, направленное на нор-

мализацию: уменьшение содержания сывороточного интерлейкина-6 (до лечения  $689,7 \pm 115,8$  пг/мл, после лечения  $449,6 \pm 102,7$  пг/мл;  $p < 0,001$ ) и интерлейкина-8 (до лечения  $1070,4 \pm 106,9$  пг/мл, после лечения  $981,4 \pm 108,8$  пг/мл;  $p < 0,001$ ).

Установлено, что у больных хроническим пиелонефритом в результате длительного рецидивирующего течения заболевания и проведения многочисленных курсов антибактериальной терапии формируется вторичная иммунная недостаточность, а именно угнетение клеточного и гуморального иммунитета, неспецифических факторов защиты, что и может явиться причиной хронизации течения заболевания.

Включение полиоксидония в комплексную терапию больных хроническим пиелонефритом оказывает иммуномодулирующее влияние и обеспечивает значительное снижение провоспалительных цитокинов, что, по всей видимости, и является регулирующим механизмом влияния препарата на факторы системы иммунитета.

Таким образом, при включении в комплексную терапию иммуномодулятора Полиоксидоний мы наблюдали положительную клиническую динамику на фоне улучшения показателей фагоцитарной активности лейкоцитов. Что касается клеточного звена иммунитета, то нами не было выявлено значимого влияния препарата на его показатели.

Анализ опыта применения Полиоксидония говорит о целесообразности использования иммунокоррекции в комплексной терапии больных хроническим пиелонефритом, поскольку это позволяет получить положительную клиническую динамику, улучшить состояние иммунитета и повысить эффективность проводимого лечения.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Лебедев К. А. Иммунная недостаточность: выявление и лечение. М: Медицинская книга, Н. Новгород: Изд-во НГМА, 2003.
2. Мазо Е. Б. Терапевтический архив 2007, 1, 85-89.
3. Никуличева В. И., Сафуанова Г. Ш., Лехмус Т. Ю. и др. Клиническая медицина. Бюллетень ВСНЦ СО РАМН 2014, 1 (95), 45-49.
4. Нефрология. Национальное руководство. Краткое изложение. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2014.

## POLIOKSIDONIY IN REHABILITATION OF PATIENTS WITH CHRONIC PYELONEPHRITIS

Lekhmus T. Yu.<sup>1</sup>, Germash E. I.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Bashkir State Medical University; <sup>2</sup>Republic clinic hospital, Ufa, Russia

The article describes the study of immune effectiveness of preparation Polioksidoniy in the complex therapy of patients with chronic pielonephritis.

---

## ПОЛИСАХАРИДЫ РАСТЕНИЙ ЕВРОПЕЙСКОГО СЕВЕРА РОССИИ КАК ИСТОЧНИК ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИХ ПРЕПАРАТОВ

Литвинец С. Г.<sup>1</sup>, Злобин А. А.<sup>1</sup>, Мартинсон Е. А.<sup>1</sup>, Попов С. В.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Вятский государственный университет», Киров; <sup>2</sup>ФГБУН Институт физиологии Коми НЦ УрО РАН, Сыктывкар, Россия

Изучено влияние состава, свойств и структурных особенностей углеводных цепей пектинов на спектр иммуномодулирующей и антимикробной активности. В качестве объектов исследования использовали пектины нативных растений европейского Севера России, а также пектины, полученные из каллусных тканей растений.

*Ключевые слова:* полисахариды, иммунитет, растения, структурно-химическая характеристика.

Заболевания, связанные с нарушениями иммунитета являются серьезной фундаментальной медицинской и социальной проблемой. Поэтому поиск, выделение и создание лекарственных препаратов и пищевых добавок, способных регулировать иммунные процессы, является одним из наиболее перспективных направлений современной биоорганической химии и медицины.

Возобновляемое растительное сырье издавна используется в качестве источника лекарственных средств и лечебных пищевых добавок широкого назначения. Большинство биополимеров и низкомолекулярных биорегуляторов, входящих в состав растений, обладают физиологической активностью. Однако правильное использование растительных веществ требует выделения их в индивидуальном состоянии, определения их природы и химического строения, выяснения типа действия на организм, установления оптимальных лечебных доз, изучения взаимосвязи, структуры и физиологической активности. Особенно важны все эти факторы при совместном применении нескольких биопрепаратов, что не-

редко усиливает лечебный эффект, но может сопровождаться и нежелательным, побочным действием.

Разработка методов выделения растительных биопрепаратов, развитие технологии их наработки в препаративном масштабе, изучение их строения и свойств имеет в настоящее время первостепенное значение и приведет к созданию малотоннажного производства ценных растительных препаратов.

Общепризнанно, что эффективность иммунитета в значительной мере зависит от особенностей питания. Интерес к полисахаридам связан с тем, их содержание в растительной клетке достигает 80% от сухого вещества, а также тем, что растительная пища составляет от 40 до 90% рациона человека в индустриальных и развивающихся странах соответственно. Часть растительных полисахаридов, названная «пищевыми волокнами», не утилизируется пищеварительной системой человека. Обширный клинический и экспериментальный материал свидетельствует о том, что пищевые волокна усиливают процессы иммунной защиты.

Создание новых иммуномодулирующих средств на основе растительных полисахаридов затрудняется следующими проблемами:

- сложностью выделения индивидуальных растительных полисахаридов в нативном состоянии, а также выполнения их структурно-химического анализа, что обуславливает серьезные затруднения при определении связи структуры и физиологической активности растительных полисахаридов для получения на их основе более эффективных препаратов;
- необходимостью потребления значительных количеств растительных полисахаридов (20-30 г/сут.) в течение длительного времени (несколько недель) для достижения лечебного эффекта.

Кроме того, традиционно целью фармакологического скрининга растительных полисахаридов является выявление стимулирующих веществ. Однако широкая распространенность пищевых аллергий делает необходимым создание средств, снижающих сверхчувствительность иммунной системы. С этой точки зрения, важно знать, какие особенности строения углеводной цепи регулируют переключение иммунной системы от процессов активации к состоянию толерантности. Таким образом, требуется разработка новых подходов к получению иммунологически активных полисахаридов из растительного сырья.

**Цель данной работы** – создание на основе растительных полисахаридов (пектиновых веществ) новых противоаллергических препаратов и препаратов для пероральной иммунизации, а также выявление сочетанного действия растительных полисахаридов в качестве пищевых добавок для использования их в медицине, пищевой промышленности и парфюмерии.

В ходе выполнения работы определено содержание пектиновых веществ в ряде пищевых и лекарственных растений европейского Севера России (чеснок, одуванчик, девясил высокий, фенхель обыкновенный, земляника лесная, тысячелистник обыкновенный, горец птичий, чертополох, шиповник, рябина обыкновенная, борщевик и др.). Оптимизированы условия выделения пектинов из свежего и высушенного материала, установлены их состав, свойства и особенности структурной организации их углеводных цепей. Установлена взаимосвязь структурно-химических характеристик и физиологической активности

пектиновых веществ ряда пищевых и лекарственных растений европейского Севера России. Определены условия последовательного частичного кислотного и ферментативного гидролизом пектинов, моделирующих условия гастроэнтеральной среды; изучено влияние условий обработки пектинов желудочным соком и ферментами пищеварительного тракта животных на состав и строение углеводных цепей образующихся фрагментов пектинов, входящих в состав растений, используемых в питании. Определено влияние исходных пектиновых веществ, а также продуктов их деградации на проявляемую ими антиоксидантную активность. С использованием ограниченного кислотного гидролиза и ферментативного гидролиза получены фрагменты пектиновых полисахаридов и определено их строение.

Выполнен скрининг физиологической активности пектиновых веществ, выделенных из каллусных тканей. Антиоксидантная активность водорастворимых полисахаридов и пектинов каллусных тканей рябины, лебеды и чертополоха определяется содержанием в них общих фенолов, синтез которых культурой ткани зависит от уровня экзогенных ауксинов (2,4-Д) и источника углеродного питания, входящего в состав питательной среды. Выявлены антимикробное и иммуномодулирующее действие пектиновых полисахаридов, что послужило основанием для создания препарата для пероральной иммунизации. Получены нетоксичные растительные полисахариды (пектины), которые при пероральном введении усиливают фагоцитоз, реакцию гиперчувствительности замедленного типа и синтез антител класса IgA, а также ингибируют гиперреакцию организма на пищевые аллергены. Показано, что пектин бодяка цирсиуман SE препятствует развитию аллергической реакции, механизм которого связан с уменьшением продукции IgE.

Преимуществом полученных пектинов, по сравнению с современными иммуномодуляторами природного происхождения, является отсутствие побочных эффектов. Разнообразие структур растительных полисахаридов дает возможность конструирования иммунорегуляторов, направленных на определенный антиген. Кроме того, имеется перспектива улучшения создаваемых препаратов за счет конъюгации растительных полисахаридов с белковыми иммуногенами и низкомолеку-

лярными биорегуляторами для пролонгирования и увеличения выраженности лечебного эффекта. Работа выполнена в рамках

федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России на 2009–2013 годы».

## POLYSACCHARIDES OF PLANTS OF THE EUROPEAN NORTH OF RUSSIA AS A SOURCE OF IMMUNOMODULATORY PREPARATIONS

Litvinets S. G.<sup>1</sup>, Zlobin A. A.<sup>1</sup>, Martinson E. A.<sup>1</sup>, Popov S. V.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>FGEI HE "Vyatka State University", Kirov; <sup>2</sup>FGSI Institute of Physiology, Komi Scientific Center, Ural Branch of Russian Academy of Sciences, Syktyvkar, Russia

Influence of structure, properties and structural features of carbohydrate chains of pectin on a range of their immunomodulatory and antimicrobial activity were studied. Pectin of native plants of the European North of Russia, and also callus culture pectin were used as model objects.

*Key words:* polysaccharides, immunity, plants, structural and chemical characteristic.

## ИММУННЫЙ И ОКСИДАНТНЫЙ СТАТУС ПРИ АДЕНОМИОЗЕ: КОРРЕКЦИЯ НАРУШЕНИЙ

Мальцева А. Н., Конопля А. И., Незнамова Н. В.,  
Конопля А. А.

ГБОУ ВПО Курский государственный медицинский университет, Курск, Россия

В работе установлен характер иммунных и оксидантных нарушений на системном и локальном уровнях у больных аденомиозом до и после стандартного лечения. Определена эффективность использования дополнительно к стандартному лечению Ридостина, Гипоксена и Эссенциале Н.

*Ключевые слова:* иммунный статус, оксидантные нарушения, аденомиоз.

**Актуальность.** Состояние процессов перекисидации липидов и антиоксидантной защиты в значительной степени определяет устойчивость организма к неблагоприятным воздействиям. В последние годы отмечается повышение интереса исследователей к изучению некоторых параметров перекисного окисления липидов и антиокислительной системы при генитальном эндометриозе [1], однако комплексной оценки основных звеньев системы свободно-радикального окисления при аденомиозе не проводилось и проблема определения значимости изменения активности неспецифических процессов перекисидации липидов и антиоксидантной недостаточности в развитии аденомиоза далека от разрешения [3].

Свободные радикалы запускают реакции ПОЛ и секрецию цитокинов, включая ФНО $\alpha$ , интерлейкин-6 и интерлейкин-8, что запуска-

ет и поддерживает иммунное воспаление как на местном, так и на системном уровне [2, 4].

**Цель работы.** Изучение характера иммунных и оксидантных изменений на системном и локальном уровнях у больных аденомиозом и разработка фармакологического способа коррекции нарушений.

**Используемые методы.** Под постоянным наблюдением в ОГУЗ «Областной перинатальный центр» г. Курска и ОБУЗ «Городская больница «Липецк-Мед»» г. Липецка находилось 41 пациентка в возрасте 20-35 лет с верифицированным диагнозом аденомиоз 2 стадии. В качестве контроля исследовали периферическую кровь 19 здоровых женщин того же возраста.

Количественная оценка уровней ФНО $\alpha$ , ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-4, ИЛ-2, ИЛ-10, рецепторного антагониста ИЛ-1 (РАИЛ), интерферона- $\gamma$  (ИНФ $\gamma$ ), C<sub>3</sub>, C<sub>3a</sub>, C<sub>5</sub>, C<sub>5a</sub>, C<sub>4</sub>-компонентов ком-



плементы, фактора Н и  $C_1$ -ингибитора ( $C_1$ -инг.) в плазме крови и цервикально-вагинальном смыве проводилась с помощью тест-систем (ООО «Цитокин», г. Санкт-Петербург) методом твердофазного иммуноферментного анализа.

Диагноз устанавливался на основании анамнеза, данных клинических и инструментальных методов обследования. Включение больных в исследование осуществлялось на основании информированного согласия. Стандартное лечение (СЛ) включало антибактериальную, противовоспалительную, антимикотическую терапию. 20 пациенток получали только СЛ (1-я группа), 2-я группа больных (21) дополнительно к стандартному лечению получала Ридостин (1,0 внутримышечно через 48 часов № 5), Гипоксен (1 табл. внутрь 3 раза в день, № 30), Эссенциале Н (5,0 внутривенно через 24 часа № 10).

**Основные результаты.** У больных аденомиозом при поступлении в стационар в плазме крови выявлено повышение уровня провоспалительных цитокинов (ФНО $\alpha$ , ИЛ-6, ИЛ-8), ИНФ $\gamma$  и снижение уровня противовоспалительных (ИЛ-4, РАИЛ) цитокинов и ИЛ-2. Кроме этого у данной категории пациенток при поступлении в плазме крови активируется система комплемента, о чем свидетельствует повышение уровня  $C_3$ ,  $C_4$ ,  $C_5$ ,  $C_{3a}$ ,  $C_{5a}$  компонентов комплемента и их регуляторов – фактора Н и  $C_1$ -ингибитора. На фоне проводимого комплексного лечения у пациенток с аденомиозом в плазме крови нормализуется концентрация ФНО $\alpha$ , ИЛ-2,  $C_{3a}$  и  $C_{5a}$ -компонентов системы комплемента, коррекция, но не до уровня здоровых доноров, концентрация ИЛ-6, ИЛ-8, РАИЛ,  $C_3$ ,  $C_4$ -компонентов комплемента.

У больных аденомиозом в вагинально-цервикальном смыве повышен уровень провоспалительных цитокинов (ФНО $\alpha$ , ИЛ-6, ИЛ-8), ИЛ-4, ИНФ $\gamma$ , всех изученных компо-

нентов комплемента и снижена концентрация РАИЛ, тогда как уровень ИЛ-2 не отличался от уровня здоровых доноров. Использование стандартного комплексного лечения у пациенток с аденомиозом в вагинально-цервикальном смыве полностью нормализуется лишь уровень  $C_5$ -компонента системы комплемента и частично концентрация ИЛ-6, ИЛ-8, ИНФ $\gamma$ ,  $C_3$ ,  $C_{3a}$ -компонентов системы комплемента.

Анализируя полученные результаты, определена недостаточная эффективность использования традиционного лечения в коррекции нарушений цитокинового звена иммунитета и системы комплемента у пациенток с аденомиозом особенно на локальном (местном) уровне, что обосновывает необходимость использования в дополнении к традиционному лечению иммунокорректирующего лечения у пациенток с аденомиозом.

Использование Ридостина, Гипоксена и Эссенциале Н у пациенток с аденомиозом позволило дополнительно нормализовать в плазме крови уровень ИЛ-6, ИЛ-8,  $C_3$  и  $C_4$ -компонентов системы комплемента, тогда как в вагинально-цервикальном смыве данная схема фармакотерапии позволила нормализовать концентрацию дополнительно к стандартному лечению только ИЛ-8, ИНФ $\gamma$  и  $C_3$ -компонента системы комплемента.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Адамян Л. В., Бугрова Е. Н., Сонова М. Е. и др. // Проблемы репродукции. – 2008. – № 4. – С. 6–9.
2. Гаврилюк В. П., Караулов А. В., Конопля А. И. // Иммунология. – 2011. – Т. 32, № 4. – С. 213–216.
3. Качалина Т. С., Стронгин Л. Г., Семерикова М. В., Андосова Л. Д. // Медицинский альманах. – 2010. – № 3. – С. 114–117.
4. Конопля А. А., Газазян М. Г., Петров С. В., Гаврилюк В. П. // Системный анализ и управление в биомедицинских системах. – 2006. – Т. 5, № 1. – С. 87–89.

## IMMUNE AND OXYGEN THE STATUS AT THE ADENOMYOSIS: CORRECTION OF DISTURBANCES

Maltseva A. N., Konoplya A. I., Neznamova N. V., Konoplya A. A.

*Kursk state medical university, Kursk, Russia*

In work character immune and oxidative disturbances at system and local levels at sick of an adenomyosis before standard treatment is established. Efficiency of use in addition to standard treatment of Ridostina, Gipoksena and Essentiale H is defined.

*Key words:* immune status, oxygen disturbances, adenomyosis.

## ИММУНОКОРРИГИРУЮЩАЯ ТЕРАПИЯ ПРИ ВНУТРИБОЛЬНИЧНОЙ ПНЕВМОНИИ У ДЕТЕЙ РАННЕГО ВОЗРАСТА

Мовлонова Ш.С.

Республиканский Специализированный Научно-Практический Медицинский Центр  
Педиатрии МЗ РУз, Ташкент, Узбекистан

Обследовано 150 больных, из них 110 детей с внутрибольничной пневмонией и 40 детей с внебольничной пневмонией. Отмечается достоверное снижение CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> – лимфоцитов, повышение CD16<sup>+</sup>, CD20<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup>- лимфоцитов у больных ВБП по сравнению с показателями ВП. Дифференцированное лечение оказывало положительное влияние и на содержание в крови естественных киллеров – CD16<sup>+</sup>-лимфоцитов. Причем, разница в показателях CD16<sup>+</sup> до и после лечения была достоверной только во II, III группах больных ( $P < 0,01$  соответственно  $P < 0,001$ ), в то время как в I группе эти показатели не имели достоверной разницы ( $P > 0,05$ ).

*Ключевые слова:* нозокомиальная пневмония, дети, иммунокорригирующая терапия.

**Актуальность.** Внутрибольничная пневмония (ВБП), развивающаяся на фоне вторичных иммунодефицитных состояний, ухудшает прогноз и создает угрозу жизни ребенка. Известно, что иммунный ответ включает в себя разнонаправленные типы эффекторных механизмов, каждый из которых оптимален в отношении определенных патогенов. Анализ литературных данных показал, что при ВБП у детей нарушение функции иммунной системы многообразны, сложны, разноречивы и не до конца изучены.

**Цель исследования** – разработать схемы лечения внутрибольничной пневмонии у детей раннего возраста на основании взаимобусловленности полученных клинико-лабораторных данных.

**Материал и методы исследования.** В настоящей работе обследовано 150 больных, из них 110 детей с ВБП и 40 детей с внебольничной пневмонией (ВП), находившихся на лечении в отделениях реанимации и интенсивной терапии, пульмонологии и детей раннего возраста РСНПМЦ Педиатрии МЗРУз. Проводились клинические, лабораторные, детально изучались иммунологические методы исследования иммуноферментным методом.

В зависимости от вида проводимой терапии обследованные дети были разделены на три

группы: I группу составили 40 больных детей с ВБП получавших базисную терапию. II группу составили 35 больных детей с ВБП, получавших на фоне базисной терапии Полиоксидоний 3мг по схеме. III группу составили 35 больных детей с ВБП, получавших базисную терапию, Полиоксидоний и Витрум беби.

**Результаты исследований.** В предыдущих публикациях были представлены иммунологические данные: наблюдалось достоверное снижение относительного количества CD3<sup>+</sup>-лимфоцитов до  $43,4 \pm 0,8\%$  ( $61,5 \pm 1,2\%$ ) ( $P < 0,001$ ), CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов до  $27,1 \pm 0,7\%$  ( $39,1 \pm 0,5\%$ ) CD8<sup>+</sup>-лимфоцитов до  $15,2 \pm 0,5\%$  по сравнению с показателями ВП  $19,5 \pm 1,1\%$  ( $P < 0,01$ ), достоверным повышением относительного количества CD20<sup>+</sup>-лимфоцитов, что составило  $28,6 \pm 0,5\%$  по сравнению с показателями ВП –  $16,4 \pm 1,1\%$  ( $P < 0,01$ ) и CD16<sup>+</sup>-лимфоцитов до  $16,8 \pm 0,4\%$  по сравнению с показателями ВП  $10,2 \pm 0,5$  ( $P < 0,001$ ). Со стороны гуморального звена иммунитета, которое выражалось понижением уровня в сыворотке крови IgA и IgM, что составило  $44,5 \pm 2,5$  мг,%;  $92,4 \pm 3,1$  мг,% соответственно, по сравнению с ВП ( $78,4 \pm 3,2$  мг,%;  $121,4 \pm 4,9$  мг,%,  $P < 0,01$ ).

В настоящей работе обсуждаются результаты анализа различных терапевтических подходов в лечении детей с ВБП.

Прослежена динамика изменения состояния иммунной системы под влиянием дифференцированного лечения больных с ВБП. У детей II группы наблюдалась активация показателей клеточного иммунитета, о чем свидетельствует прирост относительного числа CD3<sup>+</sup>-лимфоцитов, 52,5±1,8% при норме (61,5±1,2%), достоверный по отношению к I группе больных (P<0,01). Субпопуляции CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов повышались у детей во II группе после лечения по отношению показателей I группы больных (P<0,01). Субпопуляции лимфоцитов, несущие маркеры CD8<sup>+</sup>, также имели положительную динамику под влиянием комплексной терапии, в то время как в I группе достоверных изменений в показателях не наблюдалось (P>0,05). Аналогичная тенденция имеет место на уровне начального этапа гуморального иммунитета, наблюдается повышение CD20<sup>+</sup>-лимфоцитов по сравнению с I группой (P<0,01), что составило в относительном значении 19,5±0,58%. Наблюдалась положительная динамика показателей естественных киллеров – CD16<sup>+</sup>-лимфоцитов. Причем, разница в показателях CD16<sup>+</sup> до и после лечения была достоверной во II группе больных (P<0,01), в то время как в I группе эти показатели не имели достоверной тенденции (P>0,05).

После проведенного лечения у детей, получавших в комплексе традиционной терапии Полиоксидоний и Витрум бэби, (III группа) наблюдалось активация показателей клеточного иммунитета, о чем свидетельствует прирост относительного числа CD3<sup>+</sup>-лимфоцитов, составляющий 62,1±1,8%, достоверный по отношению показателей I группы больных (P<0,001). Субпопуляции CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> также повышались после лечения в III группе, по отношению к исходным данным (P<0,001), и показателям II группы больных (P<0,01). Субпопуляции лимфоцитов, несущие маркеры CD8<sup>+</sup>, также имели положительную динамику под влиянием комплексной терапии, в то время как во II группе достоверных изменений в показателях не наблюдалось. Соответственно иммунорегуляторный индекс в группе больных, получивших дифференцированное лечение приближался к нормальным показателям, в отличие от показателей ИРИ во II группе, где он оставался стабильно низким. ИРИ у больных с ВБП после лечения составлял 1,8±0,08 и 1,6±0,04 соответственно (P<0,05). У больных III группы, получав-

ших дифференцированное лечение, уровень CD20<sup>+</sup>-лимфоцитов снизился до 16,4±0,9%, тогда как во II группе после лечения составил 10,6±0,8% (P<0,01). Дифференцированное лечение оказывало положительное влияние и на содержание в крови естественных киллеров – CD16<sup>+</sup>-лимфоцитов. Разница в показателях CD16<sup>+</sup> до и после лечения была достоверной только в III группе больных (P<0,01), в то время как во II группе эти показатели не имели достоверной разницы (P>0,05). Позитивное влияние комплексной терапии на активность гуморального иммунитета их содержание у детей II и III группы, более существенно приближается к нормативным показателям и составляет 801,0±20,0 мг%; 160,0±5,0 мг%; 100,0±5,0 мг% и 990,0±14,0 мг%; 120,0±5,0 мг%; 121,0±6,0 мг% соответственно, в отличие от больных I группы (P от <0,05 до P<0,01).

Анализ результатов цитокинового профиля при дифференцированном лечении показал, что у детей II и III группы происходит снижение уровней ИЛ-1β и ИЛ-4. Уровень ИЛ-1β после лечения снизился у больных обеих групп, составляя в среднем 125,6±10,5 пг/мл и 120,1±9,6 пг/мл соответственно (P<0,01; P<0,001), в то время как в I группе эти показатели не имели достоверной разницы (P>0,05). Концентрация ИЛ-4 у детей II и III группы после комплексного лечения составила 70,1±0,8 пг/мл и 69,4±4,4 пг/мл соответственно, по отношению к показателям I группы (P<0,05).

Таким образом, дифференцированные методы лечения потенцируют эффективность антибактериального лечения ВБП, благодаря чему быстрее нормализуются измененные лабораторные и иммунологические показатели крови, сокращается число койко-дней, снижается риск тяжелых затяжных форм и неблагоприятных исходов ВБП.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гельфанд Б. Р., Гологорский В. А. Белоцерковский Б. З. // *Consilium medicum* 2001;3 (7): 62-64.
2. Белоусов Ю. Б. // *Лечащий врач*: 1999:4
3. Европейское руководство по клинической оценке противомикробных лекарственных средств. Под ред. Т. R. Beam Jr., D. N. Gilbert, C. M. Kunin. Пер с англ. Смоленск: Амипресс, 1996, 320 с
4. Сотников А. В., Попа А. В., Салтанов А. И. // *Вестник интенсивной терапии*, 2011 № 3 С. 28-32.

## IMMUNOTHERAPY OF NOSOCOMIAL PNEUMONIA IN YOUNG CHILDREN

Movlonova Sh.S.

Examined 150 patients, including 110 children with nosocomial pneumonia, 40 children with community-acquired pneumonia. Observed a significant decrease in CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> lymphocytes increase CD16<sup>+</sup>, CD20<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup> of lymphocytes compared with community-acquired pneumonia. Difference treatment had a positive effect on blood levels of natural killer- CD16<sup>+</sup> lymphocytes and the difference in terms CD16<sup>+</sup> of before and after treatment was significant only in the I.III groups of patients while in group 1, these figures had no significant difference.

*Key words:* nosocomial pneumonia, children, immunotherapy.

---

---

## ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПАТОГЕНЕТИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ ВНЕБОЛЬНИЧНОЙ ПНЕВМОНИИ

Мухамадиева Л. Р., Мавзютова Г. А., Фазлыева Р. М.,  
Амирова Г. Ф., Камаева Э. Р.

*ГБОУ ВПО Башкирский государственный медицинский университет, Уфа, Россия*

Проведенное обследование 105 больных внебольничной пневмонией с тяжелым и среднетяжелым течением заболевания показало, что включение иммунофана и полиоксидония в комплексную терапию, оказывает выраженное положительное воздействие на клиническое течение заболевания и нормализацию иммунного статуса. Под влиянием иммунокорректирующей терапии иммунофаном и полиоксидонием у больных внебольничной пневмонией нормализуются показатели клеточного иммунитета и неспецифической резистентности, что является критерием клинической и иммунологической эффективности иммуномодуляторов.

*Ключевые слова:* внебольничная пневмония, иммунофан, полиоксидоний.

В патогенезе ВП ведущую роль играют массивная и вирулентная инфекция, снижение неспецифической резистентности организма, дисбаланс локального и системного иммунитета, нарушение процессов свободно-радикального окисления [1], следовательно, лечение ВП должно быть комплексным, затрагивающим все звенья патогенеза, в том числе иммунологическое. В этой связи представляет интерес клинико-иммунологическая оценка эффективности препаратов с доказанной иммуномодулирующей активностью, таких как, полиоксидоний и иммунофан в лечении тяжелых форм внебольничной пневмонии. Если учесть роль перекисного окисления в патогенезе воспаления, то положительным однонаправленным эффектом указанных иммуномодуляторов является антиоксидантная активность, что по-

зволяет применить их в комплексной терапии ВП [1]. В то же время имеются и некоторые особенности влияния препаратов на различные звенья иммунологической защиты – более выраженный антиоксидантный и адьювантный эффект полиоксидония, что позволяет использовать эти препараты и в остром периоде воспаления в комплексе с антибактериальной терапией [1].

**Цель исследования:** изучить клинико-иммунологические особенности внебольничной пневмонии различной степени тяжести и обосновать применение иммуномодуляторов иммунофана и полиоксидония в комплексной терапии заболевания.

**Материалы и методы исследования:** В исследование включено 105 больных ВП в возрасте от 18 до 65 лет со среднетяжелым и тяжелым

течением. Больные ВП со среднетяжелой и тяжелой формами заболевания (105 пациентов) были распределены на 3 группы в зависимости от предложенной нами комплексной терапии с включением иммунофана и полиоксидония: 1-я группа – 35 больных со среднетяжелой формой ВП, получавших наряду со стандартной терапией иммуномодулятор иммунофан с 3–4-го дня пребывания в стационаре в дозе 50 мкг/мл внутримышечно один раз в сутки через день № 5, в течение 10 дней; 2-я группа – 25 пациентов с тяжелой формой ВП, которым в комплексной терапии назначался полиоксидоний с 3–4-го дня пребывания в стационаре в дозе 6 мг внутримышечно один раз в сутки, через день № 5, в течение 10 дней.

Для оценки клинико-иммунологической эффективности указанных иммуномодуляторов была выделена 3-я группа (сравнения) – 45 пациентов, из них 25 больных со среднетяжелой, 20 – с тяжелой формой ВП, получавших стандартную терапию (без применения иммунокоррекции), сопоставимая с основными группами по полу, возрасту и степени тяжести. Для сравнительной оценки иммунологических показателей в исследовании использовались результаты обследования 20 здоровых доноров. Общеклиническое обследование больных проводили в соответствии с медико-экономическими стандартами. Для верификации возбудителей ВП использовались общепринятые микроскопические и бактериологические методы. Комплексное клинико-иммунологическое обследование проводилось дважды – в день поступления больных в стационар и через 10 дней после начала лечения и включало: анализ данных лейкоцитограммы капиллярной крови; оценку фагоцитарной активности в тесте с латексом с подсчетом фагоцитарного индекса (ФИ) и фагоцитарного числа (ФЧ) – определение содержания в крови С-реактивного протеина (СРБ), С3, С4 компонентов комплемента методом иммунотурбидиметрии на биохимическом анализаторе Hitachi-902 (наборы реагентов “Tina-quant”, Roche Diagnostics Corporation, USA); иммунофенотипирование лимфоцитов методом проточной цитофлуорометрии на приборе Erics XL, фирмы «Coulter» с характеристикой основных маркеров иммунокомпетентных клеток (CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup>); оценку гуморальных факторов иммунитета по концентрации иммуноглобулинов классов А, М,

Г методом иммунотурбидиметрии на биохимическом анализаторе Hitachi-902 (наборы реагентов “Tina-quant”, Roche Diagnostics Corporation, USA). Содержание циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) определялось методом преципитации с раствором полиэтиленгликоля (мол. м. 6000 Д); определение уровня цитокинов IL-4, IL-6, TNF-α иммуноферментным методом с использованием стандартных тест-систем (ООО «Протеиновый Контур-Тест», г. Санкт-Петербург).

**Результаты исследования:** Особенности иммунологической реактивности у больных с внебольничной пневмонией с более тяжелым течением характеризуются снижением уровня общих Т-лимфоцитов (CD3<sup>+</sup>), Т-хелперов-индукторов (CD4<sup>+</sup>), натуральных киллерных клеток (CD16<sup>+</sup>), ( $p < 0,05$ ), синдромом дисфагоцитоза, высоким уровнем циркулирующих иммунных комплексов, многократным увеличением уровня воспалительных цитокинов IL-4, IL-6, TNF-α, ( $p < 0,05$ ), что является показанием для иммунокоррекции. Назначение в ранние сроки заболевания в комплексе с антибактериальными препаратами иммунофана при среднетяжелой форме внебольничной пневмонии в дозе 50 мкг/мл № 5 и полиоксидония – при тяжелой форме внебольничной пневмонии в дозе 6 мг № 5, улучшают течение заболевания, способствуя регрессу воспалительного синдрома и признаков поражения легочной ткани; оказывают стимулирующее действие на факторы естественной резистентности (фагоцитоз, натуральные киллеры (CD16<sup>+</sup>)) и клеточные механизмы защиты (повышение значения общих Т-лимфоцитов (CD3<sup>+</sup>), Т-хелперов-индукторов (CD4<sup>+</sup>), ( $p < 0,05$ ), и регулирующее влияние на воспалительную активность цитокинов, вызывая снижение уровнем IL-4, IL-6, TNF-α, ( $p < 0,01$ ).

**Выводы:** Особенности иммунологической реактивности у больных со среднетяжелым и тяжелым течением ВП характеризуются депрессией факторов естественной резистентности, Т-клеточного звена системы иммунитета, на фоне относительной напряженности гуморальных факторов, нарушенным соотношением цитокинов.

Наряду с положительным клиническим эффектом иммунофана в комплексной терапии больных ВП со среднетяжелым течением, отмечалась иммуномодулирующая активность препарата, проявившаяся нормализацией

естественной резистентности, клеточного звена, уменьшением иммунокомплексного воспаления и снижением уровня провоспалительных цитокинов. Включение полиоксидония в комплексную терапию больных ВП с тяжелым течением, наряду с иммуномодулирующим влиянием на основные звенья иммунитета, оказывает регулирующее влияние на провоспалительные факторы межклеточного взаимодействия в динамике заболевания. Оба препарата имунофан и полиоксидоний при включении их в комплексную терапию

больных со среднетяжелой и тяжелой формой ВП проявили положительную клиническую направленность, проявившуюся более быстрым регрессом симптомов воспаления, поражения легочной ткани.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Внебольничная пневмония у взрослых: практич. рекомендации по диагностике, лечению и профилактике / Сост. А. Г. Чучалин, А. И. Синопальников, С. В. Яковлев, Л. С. Страчунский. – М., 2003. – 53 с.

### IMMUNOLOGICAL ASPECTS OF PATHOGENETIC THERAPY COMMUNITY-ACQUIRED PNEUMONIA

Mukhamadieva L. R., Mavzutova G. A., Fazlieva R. M., Amirova G. F., Kamaeva E. R.

*Bashkir state Medical University, Ufa, Russia*

Carried out examinations of 105 patients with severe and medium severe community-acquired pneumonia, showed us that inclusion of imunofan and polyoxidonii to the complex therapy of patients, provides positive influence on clinical diseases and normalization of immunity of human bodies. Under the effect of immunocorrectical therapy, i.e. using imunofan and polyoksidonii, human bodies who have community-acquired pneumonia, their both cell and humoral immunity indexes started becoming better. This result proves us the effectivity of immunomodulators, i.e. the usage of imunofan and polyoxidonii.

*Key words:* community-acquired pneumonia, imunofan, polioxidonii.

### АНТИМИКРОБНЫЕ ПЕПТИДЫ ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ МОДУЛИРУЮТ ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ ЕСТЕСТВЕННЫХ КИЛЛЕРНЫХ КЛЕТОК

Пазина Т. Ю.<sup>1,2</sup>, Шамова О. В.<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>ФГБНУ «ИЭМ», Санкт-Петербург, Россия; <sup>2</sup>Фокс Чейз Центр, Филадельфия, США;

<sup>3</sup>Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

Антимикробные пептиды (АМП) – молекулы системы врожденного иммунитета, могут рассматриваться как перспективные агенты для лечения опухолевых заболеваний за счет своих иммуномодулирующих и противоопухолевых свойств. В нашей работе было изучено влияние АМП на спленоциты крыс, а также на ЕК клетки человека. Было показано увеличение активности спленоцитов и ЕК клеток в отношении клеток-мишеней в присутствии АМП.

*Ключевые слова:* антимикробные пептиды, спленоциты, естественные киллерные клетки.

**Введение.** Антимикробные пептиды (АМП) нейтрофильных гранулоцитов являются эффекторными молекулами системы врожден-

ного иммунитета, которые участвуют в противоинфекционной защите за счет инактивации патогенных микроорганизмов, а также про-

явления стимулирующих эффектов в отношении клеток иммунной системы, что позволило ряду авторов рассматривать АМП как иммуномодуляторные молекулы [1].

Нейтрофилы, циркулирующие в кровяном русле или присутствующие в различных тканях, находятся в контакте с другими клетками системы врожденного и приобретенного иммунитета, а в частности с естественными киллерными (ЕК) клетками и цитотоксическими Т-лимфоцитами, которые рассматриваются как основные участники противоопухолевой защиты организма. ЕК и Т клетки, осуществляя свои защитные функции, могут вступить во взаимодействие с биологически активными молекулами, в том числе АМП, секретлируемыми нейтрофилами. Хотя известно, что ряд АМП обладает цитотоксической активностью в отношении опухолевых клеток [2,3,4], данные о влиянии АМП на функциональную активность ЕК клеток крайне немногочисленны. Исследование эффектов АМП на цитотоксическую активность ЕК клеток позволит получить новые данные о взаимодействии эффекторных молекул, продуцируемых различными клетками, участвующими в реализации защитных реакций, а также изучить фундаментальные механизмы функционирования системы врожденного иммунитета.

**Целью данной работы** являлось изучение действия антимикробных пептидов (протегрин 1 и бактенецин 5) на цитотоксическую активность спленоцитов крысы, а также ЕК клеток периферической крови здоровых доноров.

**Материалы и методы.** Для получения спленоцитов крыс селезенки помещали в забуференный физиологический раствор (ЗФР), измельчали ткань селезенки и гомогенизировали ее, процеживали через нейлоновый фильтр, и проводили в полученной клеточной суспензии гемолиз эритроцитов. Цитотоксическую активность спленоцитов определяли по их способности лизировать опухолевые клетки *in vitro*. В качестве мишеней для ЕК клеток селезенки использовали клетки миелолейкоза человека К-562 и клетки гистиоцитарной лимфомы человека U-937. Для количественной оценки цитотоксической активности использовали набор реактивов «Cell-mediated cytotoxicity kit», Invitrogen, США) и проводили эксперимент в соответствии с рекомендациями производителя набора. Клетки мишени в среде RPMI-1640

вносили в лунки пластиковых круглодонных планшетов и добавляли спленоциты (эффекторы). Планшеты с клетками инкубировали в течение 20 часов в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при 37°С, 5% CO<sub>2</sub>. С использованием флуоресцентной микроскопии подсчитывали число мертвых и живых клеток-мишеней.

Для изучения влияния АМП на ЕК клетки человека в отношении клеточной линии ММ – ММ1R лимфоциты здоровых доноров получали путем центрифугирования в градиенте плотности с применением Lymphoprep (AXIS-SHIELD Roc AS cat#1114544). Наличие ЕК клеток в составе лимфоцитов подтверждалось данными цитофлуориметрии. Клетки мишени вносили в лунки круглодонных планшетов и добавляли лимфоциты, так что соотношение эффекторов (ЕК клеток) и клеток мишеней составляло 2,5: 1. Контрольные лунки содержали: 1) клетки-мишени без клеток-эффекторов и пептидов; 2) клетки-мишени с пептидами, но без клеток-эффекторов; 3) клетки-мишени с клетками-эффекторами, но без пептидов; 4) клетки-эффекторы. Планшеты с клетками инкубировали в течение 20 часов в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при 37°С, 5% CO<sub>2</sub>. После инкубации жизнеспособность клеток-мишеней, а также количество клеток на ранней стадии апоптоза определялась с использованием набора, содержащего аннексин V и пропиридиум йодид с применением проточной цитометрии.

**Результаты.** Исследованы эффекты действия протегрин 1 (ПГ1) и бактенецин 5 (ChVac5) на цитотоксическую активность спленоцитов крысы в отношении двух типов клеток-мишеней: К-562 и U-937 в культуре. Показано, что при добавлении пептидов к клеткам (до конечной концентрации 2 мкМ) за 30 минут до внесения спленоцитов (при соотношении мишень/эффектор 1:5) достоверно увеличивается цитотоксическая активность спленоцитов, как в случае ПГ1 (примерно в 2,5 раза для К-562 и в 2 раза для U-937); так и в случае ChVac5 (в 1,5 раза для К-562 и U-937) по сравнению с контрольными пробами, где клетки-мишени инкубировались со спленоцитами без пептидов, а также пробами, в которых клетки-мишени инкубировались с пептидами или без них, но в отсутствие спленоцитов.

Установлено, что в присутствии ПГ1 и ChVac5 повышается также и цитотоксическая активность ЕК клеток человека в отношении клеток множественной миеломы че-

ловека линии MM1R *in vitro*. При добавлении ПГ1 (2 мкМ) в пробы, включающие клетки-мишени MM1R, наблюдалось уменьшение количества жизнеспособных клеток MM1R (не содержащих аннексин V и пропидиум йодид) на 8% по сравнению с контрольными, и на 9% в пробах, включающих ЕК и MM1R клетки, превышающее показатели, наблюдаемые при инкубации клеток-мишеней только с ЕК. Содержание аннексина V в MM1R, инкубируемых в присутствии ПГ1 и ЕК клеток, было увеличено в 3.2 раза по сравнению с контрольными. При добавлении ChBac5 (25 мкМ) в пробы, включающие клетки-мишени MM1R, наблюдалось увеличение количества погибших клеток (содержащих пропидиум йодид) MM1R на 64% по сравнению с контрольными. В случае добавления ChBac5 в пробы включающие ЕК и MM1R клетки, уменьшалось содержание жизнеспособных клеток MM1R (не содержащих аннексин V и пропидиум йодид), что одновременно приводило к увеличению клеток-мишеней на ранней стадии апоптоза (содержащих аннексин V без пропидиум йодида), когда общее количество жизнеспособных

клеток оставалось практически неизменным, что говорит о том, что при использовании ChBac5 клетки, в основном, погибают по пути апоптоза.

**Заключение.** Полученные данные указывают на возможную роль АМП в модулировании цитотоксических функций ЕК клеток, а также подтверждают представления об АМП, как перспективных объектах исследования для создания противоопухолевых препаратов.

Работа поддержана грантом ФЦП. Соглашение с Минобрнауки России № 14.604.21.0104 от 05.08.2014 г. RFMEFI60414X0104.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lai Y.; Gallo R. L. // Trends Immunol.– 2009- Vol. 30.– P. 131-141.
2. Шамова О. В., Сакута Г. А., Орлов Д. С. и др. // Цитология.– 2007,– Том 49, № 12.– С. 1000-1010.
3. Шамова О. В., Орлов Д. С., Пазина Т. Ю. и др. // Фундаментальные исследования.– 2012.– № 5 (часть 1),– С. 207-212.
4. H. Mei, X. Jin, J. Zhu et al., // PLoS One.– 2012.– Vol. 7. N 2: e31328.

## ANTIMICROBIAL PEPTIDES OF MAMMALS MODULATE NATURAL KILLER CELLS FUNCTIONS

Pazina T. Y.<sup>1,2</sup>, Shamova O. V.<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Institute of Experimental Medicine, St.Petersburg, Russia; <sup>2</sup>Fox Chase Cancer Center, Philadelphia, USA;

<sup>3</sup>Saint Petersburg State University, St.Petersburg, Russia

Antimicrobial peptides (AMPs) are the key components of innate immunity showed anticancer and immunomodulatory effects. We studied the effect of AMPs on splenocytes from rats and NK cells from peripheral blood of healthy donors. We showed an increase in cytotoxicity toward target cells in presence of AMPs.



## СПОСОБНОСТЬ ПРОБИОТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ БАКТЕРИЙ РОДА *VACILLUS* К БИОАККУМУЛЯЦИИ ИОНОВ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ В ОРГАНИЗМЕ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ

Сизенцов А. Н., Барышева Е. С., Бабушкина А. Е.

ФГБОУ ВПО Оренбургский государственный университет, Оренбург, Россия

В публикации представлены данные по изучению биоаккумулирующей способности пробиотических препаратов на основе бактерий рода *Vacillus* ионов свинца и кадмия при создании экспериментальной интоксикации. Полученные данные свидетельствуют о эффективном использовании пробиотиков с целью снижения уровня ионов тяжелых металлов в различных тканях лабораторных животных. В ходе эксперимента было установлено, что интенсивность извлечения как ионов свинца так и ионов кадмия составляет более 50%, при этом наиболее эффективным является препарат Споробактерин.

*Ключевые слова:* *Vacillus*, биоаккумуляция, тяжелые металлы, пробиотики.

Загрязнение окружающей среды, в первую очередь микроэлементами из группы тяжелых металлов, способствует их накоплению и, как следствие, резкому снижению биопотенциала живых систем. Как элементы-следы, некоторые тяжелые металлы (например, медь, селен, цинк) необходимы для поддержания метаболизма человеческого организма. Однако, при более высоких концентрациях они могут вести к губительным последствиям. Так, например свинец, попадая в организм человека, вызывает свинцовую интоксикацию. Особенностью металлов по сравнению с другими элементами является их тенденция к биоаккумуляции. Известно, что способность концентрировать металлы, в том числе и тяжелые, очень широко распространена в природе среди различных микроорганизмов. Большой интерес вызывает изучение данной способности среди микроорганизмов, входящих в состав пробиотических препаратов, в частности у бактерий рода *Vacillus*.

Важным является то, что входящие в состав пробиотических препаратов микроорганизмы рода *Vacillus*, являются самоэлеминирующимися антагонистами и способны оказывать антитоксическое действие, проявляющееся в активном выведении токсичных веществ из организма, в частности тяжелых металлов [1, 2].

На основании вышеизложенных данных перед нами была поставлена цель: изучить эффективность применения пробиотиков

на основе спорообразующих бактерий рода *Vacillus* при отравлении свинцом и кадмием.

Для исследования возможностей выведения ионов свинца и кадмия нами были выбраны пробиотические препараты, так как входящие в их состав бактерии рода *Vacillus* обладают уникальной способностью к биоаккумуляции металлов [3, 4]. В качестве пробиотических препаратов нами были использованы: Споробактерин (*Bacillus subtilis* 534), Бактисубтил (*Bacillus cereus* IP 5832), Ветом-2 (*Bacillus subtilis* ВКПМ В 7048 и *Bacillus licheniformis* ВКПМ В 7038). В качестве токсиканта использовали соли тяжелых металлов: сульфат кадмия и нитрат свинца. При выборе металлов исходили из того, что они являются наиболее опасными загрязнителями окружающей среды. Все исследования были выполнены на модели групп-аналогов лабораторных животных (крыс) породы «Вистер».

С целью проведения исследования из 144 особей было сформировано двенадцать групп – шесть контрольных и шесть опытных. К<sub>0</sub> – получала основной рацион, К<sub>1</sub> – основной рацион с добавлением нитрата свинца из расчета 150 мг/кг веса тела, К<sub>2</sub> – основной рацион с добавлением сульфата свинца из расчета 150 мг/кг веса тела, К<sub>3</sub> – основной рацион с добавлением «Споробактерин», К<sub>4</sub> – основной рацион с добавлением «Бактисубтила», К<sub>5</sub> – основной рацион с добавлением «Ветом 2», три опытные группы получали основной рацион с добавлением

нитрата свинца и пробиотиков – «Споробактерин» (O<sub>1</sub>), «Бактисубтил» (O<sub>2</sub>), «Ветом 2» (O<sub>3</sub>), и три опытные группы – основной рацион с добавлением сульфата кадмия и пробиотиков – O<sub>4</sub>, O<sub>5</sub> и O<sub>6</sub>, соответственно. Дозировки пробиотиков соответствовали аннотациям препаратов. Подопытные животные находились в одинаковых условиях содержания.

Соли тяжёлых металлов задавались в первый день эксперимента натошак перорально, пробиотики применяли через 12 часов после введения солей металлов с первого по седьмой день. Взятие материала проводилось с периодичностью в семь дней (фоновое исследование, седьмой, четырнадцатый и двадцать первый дни) путём убоя животных методом декапитацией.

После затравки соли металла и дачи пробиотических препаратов животные наблюдались, и проводилось взятие материала с периодичностью в семь дней (фоновое исследование, 7-й, 14-й и 21-й день) на протяжении эксперимента для отбора необходимого материала животных умерщвляли путём декапитации.

Для оценки биоаккумулирующей способности нами использовался метод атомно-абсорбционного спектрального анализа. В качестве атомно-абсорбционного спектрофотометра использовался прибор типа ААС-1 (ГДР) с набором спектральных ламп. В качестве биоматериалов нами выбраны кожный покров, костная и мышечная ткани. Пробоподготовку выполняли следующим образом: навеску биоматериала массой 5 г подвергали озолению, затем производили растворение зольных осадков в 10% азотной кислоте.

В ходе проведенных экспериментальных исследований было установлено, что наибольшей биоаккумулирующей способностью по отношению к ионам свинца обладает костная ткань, при этом как в контрольных так и в опытных группах отмечается снижение

концентрации ионов свинца и кадмия на протяжении всего эксперимента. Однако для всех опытных групп процент выведения по сравнению с контрольными группами К<sub>1</sub>, К<sub>2</sub>, был значительно выше и суммарные значения для ионов свинца во всех изучаемых тканях к 21 дню исследования составили 58,9% для группы O<sub>1</sub>, 44,5% – O<sub>2</sub> и 50,7% – O<sub>3</sub>. Для ионов кадмия аналогичные значения в опытных группах составили для группы O<sub>4</sub> – 61,5%, для групп O<sub>5</sub> и O<sub>6</sub> – 57,7% и 44,3%, соответственно.

В результате определения способности бактерий рода *Bacillus*, входящих в состав исследуемых пробиотиков, к биоаккумуляции тяжёлых металлов по средству определения концентрации их в тканях лабораторных животных установили, что препараты способствуют снижению концентрации ионов свинца и кадмия во всех исследуемых тканях. При этом наибольшей аккумулирующей способностью по отношению к ионам свинца и кадмия обладает костная ткань.

Наиболее эффективным из исследуемых препаратов при отравлении ионами свинца и кадмия является пробиотический препарат Споробактерин, а наименее эффективным при интоксикации свинцом Бактисубтил, и кадмием Ветом-2.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Сизенцов А. Н., Кван О. В., Нотова С. В., Гальченко Т. А. Вестник восстановительной медицины 2014. № 2. С 66-75
2. Сизенцов А. Н., Исайкина Е. Ю., Кван О. В., Сизова Е. А. Современные проблемы науки и образования. 2014 № 3.
3. Sizentsov A, Kvan O, Vishnyakov A., Babushkina A., Drozdova E. Life Science Journal 2014; 11 (10). P 18–20/ <http://www.lifesciencesite.com>
4. Сизенцов А. Н., Кван О. В., Гальченко Т. А. Современные проблемы науки и образования. 2013. № 5. С. 503.

#### ABILITY OF PROBIOTIC PREPARATIONS ON THE BASIS OF SORT BACILLUS BACTERIA TO BIOACCUMULATION OF IONS OF HEAVY METALS IN THE ORGANISM OF LABORATORY ANIMALS

Sizentsov A. N., Barisheva E. S., Babushkina A. E.

Studying of the bioaccumulating ability of probiotic preparations on the basis of bacteria of the sort *Bacillus* of ions of lead and cadmium at creation of experimental intoxication are presented in the publication. The obtained data testify to effective use of probiotics for the purpose of decrease in level of ions of heavy metals in various tissues of laboratory animals. During experiment it was established that intensity of extraction as ions of lead and ions of cadmium makes more than 50%, thus the most effective is the preparation Sporobakterin.

## ПЕРСПЕКТИВА ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ИММУНОМОДУЛЯТОРОВ ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ НЕБЛАГОПОЛУЧНЫХ ПЕРИНАТАЛЬНЫХ ИСХОДОВ

Скрябина В. В.

*ГБОУ ВПО Пермский государственный медицинский университет  
им. ак. Е. А. Вагнера, Пермь, Россия*

При ретроспективном анализе 238 случаев исходов беременности было установлено, что основными факторами риска развития неблагоприятных перинатальных исходов являются инфекционно-воспалительные процессы. Более эффективно снижают риск их развития препараты для санации влагалища и иммуномодуляторы и назначение лекарственных средств в I триместре. Учитывая отсутствие выраженного влияния на риск неблагоприятных перинатальных исходов от назначения гестагенов, витаминов и антибиотиков, общепринятое использование средств для санации влагалища сделан вывод о перспективности для преодоления этой проблемы назначения беременным иммуномодуляторов.

*Ключевые слова:* Риск развития неблагоприятных перинатальных исходов, эффективность назначения лекарственных средств у беременных.

Значительное влияние на течение беременности у россиянок оказывают инфекционно-воспалительные заболевания (ВЗ) – их выявляют у 67% женщин с осложненным течением гестации [3]. С ВЗ связывают самопроизвольное прерывание беременности, перинатальные потери [2, 3] и формирование ВПР у детей [1]. Сегодня отсутствуют общепринятые подходы к профилактике неблагоприятных перинатальных исходов (ПИ). Для профилактики осложнений беременности в целом чаще всего назначают гестагены (в России их получают до 24% беременных), дезагреганты, фолиевую кислоту и витамины [1, 3]. У отдельных пациенток показана польза от использования антибиотиков, иммуноглобулинов и человеческого рекомбинантного интерферона [2, 3]. Несмотря на проведение профилактических мероприятий, наша страна имеет не лучшие показатели перинатальной и младенческой смертности в мире. Поэтому интересным было проанализировать, какие факторы в большей степени увеличивают риск развития неблагоприятных ПИ, и как влияют на риски их развития назначаемые беременным лекарственные средства.

**Цель работы:** выявить факторы, увеличивающие неблагоприятные перинатальные исходы, и оценить эффективность назначаемых

беременным лекарственных средств для их профилактики.

**Материалы и методы исследования.** Проведен ретроспективный анализ 238 исходов беременности. Истории отбирали методом случайной (каждую вторую) выборки по отделению патологии беременных. Среди проанализированных было 34 случая физиологического течения беременности; 36 – осложненного угрозой прерывания в I триместре; 51 – угрозой прерывания во II, III триместрах; 51 – фетоплацентарной недостаточностью (ФПН); 33 – рождением детей с ВПР; 51 – преэклампсией; 33 – перинатальными потерями. Оценивали относительный риск (ОР) развития неблагоприятных ПИ (перинатальной смертности, формирования ВПР и гипоксии при рождении) и разницу рисков (relative risk – RR) их развития между подвергавшимися и не подвергавшимися определенным видам медикаментозного воздействия. ОР развития осложнений вычисляли по методу В. Woolf, в случаях нулевых значений использовали поправку Haldane для малых чисел, RR – по методу D. G. Altman. При оценке ОР и RR вычисляли 95% доверительные интервалы (95% ДИ).

**Результаты и их обсуждение.** Оценка ОР развития неблагоприятных ПИ показала, что развитие гипоксии у новорожденного увели-

чивают нарушения кровотока в 30-32 недели – повышение систоло-диастолического отношения (СДО) (ОР гипоксии при повышении СДО в артериях пуповины был 17,46; 95% ДИ 13,32-21,60, в маточной артерии – 15,48; 95% ДИ 6,32-24,64); бактериурия (ОР 15,18; 95% ДИ 8,74-21,62); увеличение уровня фибриногена в крови (ОР 10,62; 95% ДИ 5,68-15,56); наличие трех и более соматических заболеваний (ОР 10,18; 95% ДИ 1,48-18,88), двух и более гинекологических ВЗ в анамнезе (ОР 4,09; 95% ДИ 1,19-5,88); диагностированные до беременности вульвовагинит (ОР 9,89; 95% ДИ 1,62-18,16) и эндометрит (ОР 4,09; 95% ДИ 1,19-2,90); отклонения от показателей здоровых беременных в титрах антител (IgG) к ЦМВ (ОР 7,73; 95% ДИ 1,62-16,84), индексах avidности (ИА) антител к краснухе (ОР 10,13; 95% ДИ 4,58-15,68) и к ВПГ (ОР 5,02; 95% ДИ 1,88-8,16); угроза прерывания в I триместре (ОР 9,33; 95% ДИ 1,78-16,88); ФПН (ОР 4,43; 95% ДИ 1,19-3,24); отклонения в уровнях ХГЧ (ОР 4,91; 95% ДИ 2,89-6,93). Риск перинатальной смертности – бактериурия (ОР 5,54; 95% ДИ 1,06-8,92); изменения в ИА антител к ЦМВ (ОР 5,19; 95% ДИ 2,06-8,32); увеличение СДО в артериях пуповины (ОР 4,39; 95% ДИ 2,01-6,77 и ОР 3,80; 95% ДИ 1,55-5,35); вульвовагинит при беременности (ОР 4,95; 95% ДИ 1,63-8,23); угроза прерывания во II, III триместрах (ОР 3,02; 95% ДИ 0,98-2,06). Риск формирования ВПП у плода – высев мико- и уреоплазмы (ОР 22,46; 95% ДИ 7,99-36,94); бактериурия (ОР 8,94; 95% ДИ 1,78-16,10); отклонения в титрах антител к ЦМВ (ОР 4,49; 95% ДИ 2,06-9,62) и ВПГ (ОР 6,49; 95% ДИ 1,62-11,36); увеличение уровня фибриногена (ОР 4,39; 95% ДИ 2,01-6,77); угроза прерывания в I триместре (ОР 3,28; 95% ДИ 1,55-5,01); цервициты в анамнезе (ОР 3,21; 95% ДИ 0,89-5,53).

Наиболее заметное снижение рисков неблагоприятных ПИ было связано с назначением препаратов для санации влагалища – гексикона, тержинана и вагинорма С (РР формирования ВПП у плода – 0,36; 95% ДИ 0,18-0,71; РР перинатальной смертности – 0,47; 95% ДИ 0,20-1,12; РР гипоксии у новорожденного – 0,67; 95% ДИ 0,41-1,10) и иммуномодуляторов – иммунала, дерината, виферона (РР гипоксии – 0,56; 95% ДИ 0,27-1,17; РР перинатальной смертности – 0,68; 95% ДИ 0,25-1,87). Применение других лекарственных средств оказалось менее эффективным. У ряда препаратов отмечался

протективный эффект, но были достаточно широкие ДИ, что могло отражать неоднозначность их клинической эффективности. Такие особенности были выявлены при использовании актовегина и пираретама (РР перинатальной смертности 0,86; 95% ДИ 0,27-2,69; РР гипоксии при рождении – 0,75; 95% ДИ 0,34-1,57; РР ВПП у плода – 0,89; 95% ДИ 0,41-1,93); у проведенной в I триместре инфузионной терапии (РР перинатальной гипоксии 0,98; 95% ДИ 0,02-1,28; РР перинатальной смертности 0,37; 95% ДИ 0,05-2,57); у антиагрегантов – курантила, никотиновой кислоты и аспирина (РР перинатальной смертности – 0,71; 95% ДИ 0,33-1,52; РР гипоксии у новорожденного – 0,87; 95% ДИ 0,51-1,48). Не снижали риск неблагоприятных ПИ препараты магния – Магне В6 (РР перинатальной смертности – 1,71; 95% ДИ 0,97-3,02), антибиотики – азитромицин и вильпрафен (РР гипоксии – 1,55; 95% ДИ 0,99-2,42; РР формирования ВПП – 1,55; 95% ДИ 0,94-2,54; РР перинатальной смертности – 1,69; 95% ДИ 0,88-3,23); гестагены – дидрогестерон (РР формирования ВПП у плода – 1,63; 95% ДИ 0,92-2,88; РР гипоксии у новорожденного – 2,29; 95% ДИ 1,47-3,56; РР перинатальной смертности – 2,60; 95% ДИ 1,29-5,25); витаминные препараты для беременных и фолиевая кислота (РР ВПП у плода – 1,64; 95% ДИ 0,98-2,75; РР перинатальной смертности – 2,32; 95% ДИ 1,07-5,03; РР гипоксии – 3,44; 95% ДИ 1,92-6,18). Более эффективным оказалось раннее (до 12 недель) начало лечения – оно снижало риск перинатальной смертности (РР 0,18; 95% ДИ 0,06-0,52), гипоксии (РР 0,36; 95% ДИ 0,21-0,62) и ВПП у ребенка (РР 0,61; 95% ДИ 0,37-1,02). Начало терапии после 12 недель таким эффектом не обладало (РР гипоксии 1,63; 95% ДИ 0,99-2,66; РР перинатальной смертности 1,06; 95% ДИ 0,52-2,14).

Таким образом, наиболее значимыми и рано выявляемыми факторами риска развития неблагоприятных ПИ оказались ВЗ, а более заметное положительное влияние на ПИ было связано с использованием препаратов для санации влагалища и иммуномодуляторов и назначением лекарственных средств до 12 недель.

Выводы: Основными факторами риска развития неблагоприятных перинатальных исходов являются инфекционно-воспалительные заболевания и изменения в показателях противовирусного иммунитета.

Более эффективно снижает риск развития неблагоприятных перинатальных исходов назначение препаратов для санации влагалища и иммуномодуляторов и назначение лекарственных средств до 12 недель.

Учитывая отсутствие выраженного влияния на риск развития неблагоприятных перинатальных исходов от назначения витаминов, гестагенов и антибиотиков, общепринятое использование у беременных препаратов для санации влагалища перспективным для преодоления этой проблемы, по-видимому, является более широкое профилактическое

использование при беременности иммуномодуляторов.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Акушерство. Справочник Калифорнийского университета. Под ред. К. Нисвандера и А. Эванса. Пер. с англ. М., Практика 1999; с. 468.
2. Инфекции в акушерстве и гинекологии. Под редакцией О. В. Макарова, В. А. Алешкина, Т. Н. Савченко. Москва «МЕДпрессинформ» 2009; 464 с.
3. Сидельникова В. М., Сухих Г. Т. Невынашивание беременности: Руководство для практикующих врачей. М.: ООО «Медицинское информационное агентство» 2010; – 536 с.: ил.

## THE PROSPECT OF THE USE OF IMMUNOMODULATORS FOR PREVENTION OF ADVERSE PERINATAL OUTCOMES

Skryabina V. V.

*Perm State Medical University name ac. E. A. Wagner, Perm, Russia*

In the retrospective analysis of the medical documents of 238 women with saline and complicated pregnancies it was found that major risk factors for the development of hypoxia in the newborn, the formation of congenital malformations in fetal and perinatal mortality are infectious-inflammatory processes. Most effectively reduce the risk of their development the drugs for vaginal prophylaxis and immunomodulators, as well as prescribing the therapy up to 12 weeks of pregnancy. Given the importance of infectious and inflammatory diseases in the development of dysfunctional perinatal outcomes, the lack of marked influence on the risk of their development of progestogens and antibacterial drugs, the use of funds for vagina it was concluded of the prospects of immunomodulators for the prevention of dysfunctional perinatal outcomes.

## МИЛИАЦИН КАК ПРИРОДНЫЙ ИНГИБИТОР ПРОДУКЦИИ ОКСИДА АЗОТА ПЕРИТОНЕАЛЬНЫМИ МАКРОФАГАМИ

Смолягин А. И.<sup>1</sup>, Фролов Б. А.<sup>1</sup>, Филиппова Ю. В.<sup>1</sup>, Чайникова И. Н.<sup>2</sup>,  
Панфилова Т. В.<sup>1</sup>, Железнова А. Д.<sup>1</sup>, Сарычева Ю. А.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ГБОУ ВПО «Оренбургский государственный медицинский университет» Минздрава РФ;

<sup>2</sup>ФГБУН Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН,  
Оренбург, Россия

В работе представлены данные о способности тритерпеноида растительного происхождения – милиацина оказывать депрессивное влияние на продукцию оксида азота перитонеальными макрофагами. Обсуждаются возможные механизмы такого влияния и его значимость при оценке защитного действия милиацина при бактериальной инфекции.

*Ключевые слова:* милиацин, оксид азота, перитонеальные макрофаги.

**Введение.** Продукция оксида азота (NO) стемы (ММС) при участии индуцибельной клетками моноцитарно-макрофагальной си- NO-синтазы (iNOS) играет существенную

роль в регуляции физиологических и патологических процессов. При этом в ряде случаев действие NO отражает его участие в реализации не только защитных, но и повреждающих механизмов. Особенно ярко этот дуализм проявляется при сепсисе, представляющем системную воспалительную реакцию [1], при которой NO непосредственно участвует в формировании избыточной гипотензии, повышении сосудистой проницаемости, гибели гепатоцитов, нарушениях метаболизма и иммуносупрессии [2]. Считается, что токсические и повреждающие эффекты NO проявляются при его высоких концентрациях, обусловленных чрезмерной активацией iNOS, либо гиперэкспрессией фермента за счет усиления его синтеза. В связи с изложенным регуляция продукции NO клетками ММС и, в частности, ограничение избыточности этой продукции, представляется актуальной задачей, предполагающей возможность направленного влияния на течение и исход патологического процесса. Среди продуктов природного происхождения такая ингибирующая активность установлена для урсановых и олеаненовых тритерпеноидов [3]. Вопрос о том, является ли подобная активность прерогативой лишь этих фитостеролов, или отражает универсальную особенность, присущую и другим тритерпеноидам остается открытым.

**Целью** настоящей работы являлось изучение влияния тритерпеноида, выделенного из просяного масла – милиацина, на продукцию оксида азота перитонеальными макрофагами.

**Материалы и методы.** Донорами перитонеальных макрофагов (ПМ) служили 12 мышей (СВАхС<sub>57</sub>Bl<sub>6</sub>)F<sub>1</sub>. Животным после эвтаназии в брюшную полость вводили 7,0 мл холодной среды 199 с 10% фетальной сыворотки и гепарина (10 ед/мл). Спустя 2 минуты через разрез в паховой области извлекали клетки перитонеальной экссудата и переносили в охлажденные стерильные силиконированные пробирки. После отмывки (1000 об/мин; 5 мин) клетки взвешивали в теплой полной культуральной среде: бесцветный раствор Хенкса с 10% фетальной сыворотки, с добавлением Нерес (15 мМ), 0,01% L-глутамина и гентамицина (100 мкг/мл). Концентрацию клеток доводили до 1x10<sup>6</sup>/мл, полученную суспензию разносили в лунки планшета (0,25 мл) и инкубировали 2 часа при 37°C. Неприлипающую фракцию клеток удаляли двукратной отмывкой теплой

полной культуральной средой. Полученные таким образом ПМ культивировали в течение 48 часов в CO<sub>2</sub> инкубаторе. С целью активации NO-синтазы в начале культивирования добавляли LPS (10 мкг/мл). Для культивирования ПМ, полученные от каждого животного, распределяли в трех группах лунок, в которых инкубация клеток проводилась: 1) только в культуральной среде (группа сравнения); 2) в среде, содержащей различные концентрации милиацина (1,0; 5,0 и 10,0 мкг/мл), приготовленные с использованием в качестве растворителя детергента (твин 21) – опыт; 3) в среде с добавлением растворителя для милиацина – твина 21 (контроль) в концентрациях (3,3x10<sup>-7</sup> моль/л; 1,6x10<sup>-6</sup> моль/л и 3,3x10<sup>-6</sup> моль/л), соответствующих расчетному содержанию детергента в опытных лунках. Исследование каждой клеточной культуры дублировали. После окончания инкубации супернатанты всех проб подвергали фильтрованию (фильтр 10000 MW) и заморозке (-20°C). Содержание NO определяли с использованием тест-системы Total NO/Nitrite/Nitrate Assay по уровню его стабильного метаболита – нитрита.

Результаты выражали в виде медианы (Me), нижних (Q<sub>25</sub>) и верхних (Q<sub>75</sub>) квартилей. Значимость различий определяли с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни. Результаты считались статистически достоверными при p < 0,05.

**Результаты и обсуждение.** Инкубация ПМ (группа сравнения) сопровождалась продукцией NO: уровень нитритов (Me; Q<sub>25</sub> – Q<sub>75</sub>) в культуральной среде составил 211,0 (176,0–275,8) мкмоль/л.

В контрольных пробах изменения продукции NO зависели от концентрации детергента. В минимальной концентрации (3,3x10<sup>-7</sup> моль/л) он способствовал значимому увеличению этой продукции: содержание нитритов возросло до 372,0 (328,8–414,0) мкмоль/л. Более высокие концентрации (1,6x10<sup>-6</sup> моль/л и 3,3x10<sup>-6</sup> моль/л) вызывали дозозависимый ингибирующий эффект, соответственно, до уровней 70,5 (14,5–116,3) мкмоль/л и 22,5 (14,3–28,0) мкмоль/л.

Влияние милиацина (опыт) на продукцию оксида азота характеризовалось ее выраженной депрессией при всех использованных дозах тритерпеноида (1,0; 5,0 и 10,0 мкг/мл), в присутствии которых содержание нитритов составляло 138,0 (119,3–159,3) мкмоль/л; 27,0 (17,8–

34,5) мкмоль/л и 43,0 (20,3–51,3) мкмоль/л. Сопоставление этих показателей с данными соответствующих контрольных проб свидетельствует о том, что ингибирующее влияние милиацина на продукцию NO реализовывалось в условиях совместного использования фитостерола с растворителем как в концентрации последнего, повышающей продукцию оксида азота, так и в концентрациях оказывающих на нее угнетающее воздействие.

Оценивая разнонаправленные изменения продукции NO в присутствии растворителя важно отметить принадлежность последнего к группе неионных детергентов, отличительной особенностью которых является способность к разрушению белково-липидных и межлипидных взаимодействий при отсутствии, как правило, денатурации самих белков. В связи с этим очевидно, что эффекты детергента опосредовались его влиянием на липидное окружение интегрированных белков, имеющих отношение к сигнальным каскадам, активирующим iNOS и (или) усиливающим ее продукцию *de novo*. Следствием такого влияния могли стать как активация этих каскадов, так и их ингибирование, например, в результате усиления или нарушения формирования мультибелковых комплексов на внутренней стороне цитоплазматической мембраны.

Впервые полученные данные о способности милиацина снижать продукцию NO ма-

крофагами представляются важными как при трактовке защитного действия фитостерола при острой бактериальной инфекции [4], так и в плане его дальнейшего изучения в качестве природного ингибитора продукции NO. Механизм такого влияния при использовании олеаненовых и урсановых тритерпеноидов обусловлен нарушением индукции синтеза iNOS через угнетение активации NF- $\kappa$ B, ограничение его ядерной транслокации и взаимодействия с ДНК. При схожести данного механизма с действием глюкокортикоидов (ГК), считается, что тритерпеноиды имеют самостоятельный канал своего влияния, поскольку оно имеет место и в условиях блокады ГК-рецепторов [3,5]. С учетом редокс-зависимости NF- $\kappa$ B представляется вероятным, что инициальное звено ограничения его активности может быть связано с антиоксидантной активностью милиацина.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Черешнев В. А., Гусев Е. Ю., Зотова Н. В. Рос. физиол. ж. 2010, 7, 696-707.
2. Fortin C. F., Mc. Donald P. P., Fülöp T., Lesur O. Shock 2010, 33, 344-352.
3. Honda T., Rounds B. V., Bore L. et al. J. Med. Chem. 2000, 43, 4233-4246.
4. Фролов Б. А., Чайникова И. Н., Филиппова Ю. В. и др. Журн. микробиол. 2014, 5, 8–12.
5. Haridas V., Arntzen C. J., Gutterman J. U. Proc. Natl. Acad. Sci USA 2001, 98 (20), 11557-11562.

### MILIACIN AS A NATURAL INHIBITOR IN THE PRODUCTION OF THE NITRIC OXIDE BY PERITONEAL MACROPHAGES

Smolyagin A.I.<sup>1</sup>, Frolov B.A.<sup>1</sup>, Filippova Y.V.<sup>1</sup>, Chainikova I.N.<sup>2</sup>,  
Panfilova T.V.<sup>1</sup>, Zheleznova A.D.<sup>1</sup>, Sarycheva Y.A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Orenburg State Medical University; <sup>2</sup>Institute for Cellular and Intracellular Symbiosis, UrD RAS, Orenburg, Russia

The paper presents the data of the ability of the plant origin triterpenoid – miliacin which makes a depressive effect on the production of nitric oxide by peritoneal macrophages. Possible mechanisms of such influence and its importance in the evaluation on the protective action of miliacin in the bacterial infection are discussed here.

**Keywords:** miliacin, nitric oxide, peritoneal macrophages.

## ЛОКАЛЬНАЯ ТЕРАПИЯ КАНДИДОЗА РОТОВОЙ ПОЛОСТИ В ГРУППЕ ЧАСТО БОЛЕЮЩИХ ДЕТЕЙ

Снимщикова И. А., Халилов М. А., Шманева И. А.,  
Плотникова М. О.

ФГБОУ ВПО «Орловский государственный университет», Орёл, Россия

В статье представлены данные по исследованию локального и системного иммунитета детей с кандидозным поражением ротовой полости и клинико-иммунологической эффективности применения топической антимикотической терапии препаратом Кандид при кандидозе полости рта.

*Ключевые слова:* кандидоз, локальный иммунитет, антимикробные пептиды, кателицидины, системный иммунитет

Значительный рост заболеваемости дерматомикозами объясняет актуальность этой проблемы в настоящее время. Микозные поражения кожи и слизистых регистрируются у 5-20% населения. В структуре дерматомикозов лидирующие позиции занимает кандидамикоз слизистых оболочек, до 40% случаев которого составляет орофарингеальный кандидоз.

Наряду с этим возрастает проблема устойчивости патогенных грибов к противогрибковой терапии, что диктует необходимость разработки современных технологий в диагностике и лечении. Известно, что важную роль в хронизации кандидозной инфекции играют нарушения местной антиинфекционной защиты ротовой полости и системного иммунитета [1, 2, 3], но клинико-иммунологическое обоснование эффективности применения топических антимикотиков изучено недостаточно и нуждается в уточнении для выработки комплексного подхода к терапии.

**Целью работы** явилось изучение клинико-иммунологической эффективности применения топической антимикотической терапии препаратом Кандид при кандидозе полости рта.

**Материалы и методы.** В исследование было включено 50 детей в возрасте от 3 до 8 лет группы диспансерного наблюдения «часто болеющие дети» с различными формами кандидозного поражения слизистых ротовой полости.

Диагноз кандидоза ротовой полости ставился на основании клинической картины и микробиологических исследований, проведенных у всех больных до и после лечения.

Все дети после постановки диагноза кандидамикоз получали 1% раствор клотримазола (Кандид, Гленмарк, Индия) в виде протирания очагов поражения.

С целью оценки показателей локального и системного иммунитета больных осуществлялся забор слюны и сыворотки крови до и после лечения, при этом изучали уровень иммуноглобулинов А, М, G, оксида азота, антимикробных пептидов LL-37/hCAP18 и лактоферрина, цитокинов (ИЛ-1 $\beta$ , РА ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-10, ФНО- $\alpha$ , ИФН- $\gamma$ , ТФР- $\beta$ 1).

**Результаты и выводы.** В последние годы установлено, что среди факторов врождённого иммунитета важное место занимают противомикробные пептиды (ПМП), которые, обеспечивая «мгновенный иммунитет» («instant immunity»), выполняют функцию эндогенных антибиотиков и играют роль сигнальных молекул, вовлечённых в процессы активации клеток иммунной системы и репарации тканей [2, 3, 4].

LL37/hCAP18 является единственным идентифицированным человеческим кателицидином, проявляющим плеiotропное антимикробное и иммунорегуляторное действие [4]. Изучение уровня LL37/hCAP18 в слюне и сыворотке крови больных оральным кандидозом показало, что значительное снижение его концентрации в слюне сочетается в 94% случаев с повышением его уровня в сыворотке крови.

Изучение содержания цитокинов показало, что уровень ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-6 и ФНО- $\alpha$  в слюне и сыворотке крови был достоверно выше, чем у здоровых детей (на 50-76%; 28-42% и 36-48%,



соответственно). При этом ИЛ-8 ни у больных, ни у здоровых лиц в сыворотке крови не определялся, уровень его был повышен только в слюне (до  $315,6 \pm 60,7$  пкг/мл). Уровень ИФН- $\gamma$  в биологических жидкостях был снижен (до 40%), концентрация ИЛ-10 повышена (в среднем на 15-35%), что может свидетельствовать о нарушении функциональной активности CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов и «шифте» в сторону Th2 клеток. Изменений в продукции ТФР- $\beta$ 1 не было выявлено. Концентрация рецепторного антагониста ИЛ-1 (РА ИЛ-1) у большинства больных детей по сравнению с группой здоровых доноров была повышена более чем в 5 раз, причем значительное повышение его уровня сочеталось с неблагоприятным течением локального воспалительного процесса.

Лактоферрин – многофункциональный острофазовый железосодержащий белок, обнаруженный в секретах слизистых оболочек. Показано, что его уровень повышается при многих воспалительных заболеваниях [5]. В связи с этим представляло интерес исследовать содержание лактоферрина в слюне пациентов с орофарингеальным кандидозом. При этом было выявлено достоверное снижение концентрации лактоферрина в группе детей с кандидозными поражениями по сравнению с группой здоровых лиц.

Оксид азота обладает выраженным кандидостатическим, но не кандидоцидным действием. Исследование уровня метаболитов NO в биологических жидкостях больных показало, что фоновые показатели уровня NO в сыворотке крови и слюне были выше, чем у здоровых лиц ( $3,1 \pm 0,24$  мкмоль/л и  $3,2 \pm 0,12$  мкмоль/л) и составили  $4,7 \pm 0,6$  мкмоль/л и  $5,6 \pm 0,3$  мкмоль/л, соответственно.

На фоне кандидозной инфекции регистрировалось снижение (до 20%) концентраций в слюне IgG, IgM, IgA, sIgA при отсутствии изменений указанных показателей в сыворотке крови.

При анализе результатов микробиологического исследования из полости рта было уста-

новлено, что в 86% случаев был выделен вид *C. albicans*, а в 14% – *C. krusei* и/или *C. tropicalis*.

Основываясь на приведенных фактах, нами были выполнены исследования по изучению целесообразности использования топического антимикотика Кандид при кандидозном стоматите. Проведенное лечение 50 детей показало, что препарат Кандид является высокоэффективным средством лечения кандидамикоза полости рта. Так, у 30 детей (60% случаев) положительные результаты появились на 3 сутки применения препарата. У 12 детей (24%) – на 5 сутки и 8 детей (16%) на 7 сутки. Полное исчезновение наружных проявлений кандидамикоза в полости рта регистрировалось на 9-12 сутки.

Кроме того, при курсовом приеме препарата Кандид не было отмечено ни одного случая отрицательных проявлений у детей.

Следует также отметить, что на фоне лечения по мере купирования локального воспалительного процесса у всех больных наблюдалось достоверное улучшение показателей локального и системного цитокинового статуса, продукции оксида азота и антимикробных пептидов, с их нормализацией у 46-54% детей.

Анализ результатов проведенных исследований позволяет сделать заключение о перспективности использования в программах комплексного лечения кандидоза ротовой полости топической антимикотической терапии препаратом Кандид.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Шабашова Н. В. Проблемы медицинской микологии. – 2010. – т. 12, № 4. – с.3–9.
2. Kuyama K., Sun Y., Taguchi C. et al. Open Journal of Stomatology, 2011. – Vol.1. – P. 212-217.
3. Moyes D. L., Naglik J. R. Dev. Immunol. – 2011: 346307.
4. Plotnikova M. O., Shmaneva I. A., Snimshchikova I. A. European Science and technology, December 24-25, 2014. Vol.1
5. Fine D. H. J DENT RES, March 17, 2015

## LOCAL THERAPY OF ORAL CANDIDIASIS IN GROUP OF FREQUENTLY ILL CHILDREN

Snimshchikova I. A., Khalilov M. A., Shmaneva I. A., Plotnikova M. O.

Orel state university, Orel, Russia

The article presents data on the study of local and systemic immunity of children with oral candidiasis, clinical and immunological effects of topical antimycotic therapy with Candid drug at oral candidiasis.

## КЛИНИКО-ИММУНОЛОГИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ АМИКСИНА В ЛЕЧЕНИИ МНОЖЕСТВЕННЫХ ПАПИЛЛОМ КОЖИ

Степанова О. В., Писклакова Т. П.

*ГБОУ ВПО Южно-Уральский государственный медицинский университет,  
Челябинск, Россия*

Применение Амиксина в комплексном лечении множественных папиллом кожи позволило снизить частоту рецидивов процесса более чем у 80% пациентов. Уровни интерферонов INF- $\gamma$  и INF- $\alpha$  на фоне приема Амиксина увеличились соответственно в 2,3 и 2,1 раза в сравнении с исходными и сопоставимы с уровнем здоровых лиц, что свидетельствует о нормализующем индуктивном действии препарата в отношении сбалансированной продукции интерферонов и позволяет использовать Амиксин в терапии множественных папиллом кожи.

*Ключевые слова:* множественные папилломы кожи, амиксин, рецидивы, интерфероны.

Вопрос об эффективной терапии множественных папиллом кожи и предупреждении рецидивов процесса является предметом широкой дискуссии среди дерматологов. Кожные заболевания, как правило, протекают хронически, носят упорно-рецидивирующий характер, что определяет необходимость длительного или повторного лечения [1]. Широко используемые на сегодняшний день деструктивные методы лечения множественных папиллом кожи, включающие механическое, физическое и химическое удаление новообразований не предупреждают развитие рецидивов, возникающих более чем у половины пациентов в короткие сроки. Имеются сведения о положительных результатах применения иммуноотропных препаратов у пациентов с папилломатозом слизистых оболочек [2]. Применение иммунокорректирующих препаратов в комплексной терапии множественных папиллом кожи малоизучено.

**Материалы и методы исследования:** В исследование включены 63 пациента с множественными папилломами кожи, средний возраст составил  $44,2 \pm 3,7$  (исходная группа). Диагноз верифицирован на основании гистологического исследования. Всем пациентам производилась деструкция элементов методом электрокоагуляции, далее методом простой рандомизации они были разделены на 2 равновеликие группы. В первую (груп-

пу сравнения) вошли 32 человека, которым было произведено только механическое удаление папиллом. Пациентам второй (основной) группы (31 пациент) сразу же после деструкции элементов был назначен один курс препарата Амиксин (Тилорон) – обладающего противовирусным действием с иммуномодулирующей активностью. Препарат назначался в дозе 125 мг/сут в течение первых 2 дней, затем по 125 мг через день в течение 2 месяцев. Курсовая доза – 2,5 г. Оценку клинической эффективности проводили в режиме динамического мониторинга срока рецидивирования основного процесса. Контрольными точками клинического наблюдения являлись 1 месяц, 3 месяца, 6 месяцев и 12 месяцев после окончания полного курса лечения. Материалом для исследования послужила венозная кровь, взятая натощак. Определение количества цитокинов TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , антител к INF- $\gamma$  (пг/мл) проводили с помощью тест-систем производства ЗАО «Вектор-Бест», г. Новосибирск. Статистическая обработка проводилась с применением пакета прикладных программ Statistica for Windows vers. 6.0.

**Результаты и обсуждение:** Во время приема препарата 8 человек (12,6%) отмечали диспепсические реакции со стороны ЖКТ, не требовавшие отмены препарата. В группе пациентов, не принимавших препарат

Амиксин (группа сравнения), через 1 месяц после окончания полного курса рецидив зафиксирован у 1 пациента из 32 (3,1%), через 3 месяца еще у 3 пациентов (9,37%), спустя 6 и 12 месяцев наблюдения рецидивирование процесса отмечено еще у 5 и 7 человек (соответственно 15,6 и 21,8%). Из группы пациентов получавших Амиксин в составе комплексного лечения (основная группа) первый рецидив заболевания возник лишь спустя 6 месяцев (1 человек из 31, что составило 3,22%), через 12 месяцев после окончания приема Амиксина в курсовой дозе 2,5 г, рецидив заболевания возник еще у 2 пациентов (6,45%), что достоверно отличалось от группы сравнения ( $p=0,001$ ). Таким образом, в контрольной точке 12 месяцев в основной группе рецидив кожного процесса отмечен у 3 человек из 31, что составило 9,67%, против 50% в группе, не получавшей Амиксин в комплексном лечении. Этот показатель достоверно отличался от группы сравнения ( $p=0,002$ ). Рецидивирование процесса, как правило, происходило на том же кожном эпителии, что и первичные элементы. В основной группе пациентов рецидивирование процесса происходило на уровне подмышечных впадин (1 чел, 3,22%), на коже шеи (1 чел, 3,22%) и под молочными железами у женщин (1 чел, 3,22%). В группе сравнения отмечена полилопность процесса и сочетанное поражение кожных эпителиев: поражение подмышечных впадин отмечено у 5 пациентов (15,6%), шеи – у 4 пациентов (12,5%), локализация элементов под молочными железами установлена у 2 человек (6,25%), на голове – у 1 пациента (3,12%), сочетанное расположение элементов на коже шеи и в области подмышечных впадин обнаружено у 2 человек (6,25%), поражение кожи под молочными железами, подмышечной области и шеи зафиксировано у 1 пациента (3,12%). Среднее количество папиллом вновь появившихся при рецидивировании процесса и приходящееся на одного человека в группе получавших препарат Амиксин было достоверно меньшим в сопоставлении с группой сравнения. Оценка иммунологической эффективности препарата Амиксин на основе детекции в сыворотке крови уровней интерферонов альфа и гамма осуществлялась сразу после окончания полного курса препарата Амиксин. Уровни интерферонов  $\alpha$  и  $\gamma$  у па-

циентов группы сравнения, оставались практически идентичными с показателями исходной группы, однако, достоверно отличаясь от группы здоровых лиц ( $p=0,001$ ) и пациентов основной группы принимавших Амиксин в терапии сопровождения (0,0001). Уровень INF- $\gamma$  в основной группе после лечения иммуномодулятором вырос в 2,3 раза, уровень INF- $\alpha$  увеличился в 2,1 раза, что обусловлено индуктивным действием иммуномодулятора Амиксин в отношении продукции собственных интерферонов клетками-продуцентами. Следует отметить, что пациенты принимавшие Амиксин за время приема препарата ни разу не отмечали рецидивирования лабиальной герпетической инфекции, острых респираторных вирусных заболеваний. Количество интерферонов после их индукции Амиксином в основной группе не имеет достоверных отличий с группой здоровых лиц, что свидетельствует об их сбалансированной продукции, предотвращающей развитие нежелательных побочных эффектов, собственных экзогенно введенным в организм препаратов готовых интерферонов. Индукторы интерферона обладают рядом преимуществ по отношению к готовым препаратам интерферонов: отсутствием антигенности, сбалансированным контролируемым синтезом интерферонов *de novo*, что предотвращает побочные эффекты, которые наблюдаются при передозировке интерферонов; однократное введение индукторов приводит к длительной продукции интерферонов в терапевтических дозах. Степень прироста уровней эндогенных интерферонов гамма и альфа в основной группе пациентов, получавших Амиксин оказался значительно выше аналогичных уровней к группе сравнения, показатели которой имели напротив, отрицательную динамику уровней интерферонов, что доказывает выраженный интерферогенный эффект Амиксина, применяемого в комплексном лечении пациентов с множественными папилломами кожи.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Баткаев Э. А., Кицак В. Я., Корсунская И. М., Липова Е. В. Вирусные заболевания кожи и слизистых. – М.: Пульс. – 2001. – С. 45–50.
2. Логинова Н. С., Логинов В. В. // Terra Medica. – 2004. – № 3. – С. 3–5.

## CLINICAL AND IMMUNOLOGICAL EFFICACY IN THE TREATMENT OF MULTIPLE AMIKSIN SKIN PAPILOMAS

Stepanova O. V., Pisklakova T. P.

*Medical University of South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russia*

Amiksin application in treatment of multiple skin papillomas possible to reduce the frequency of relapses process more than 80% of patients. Levels of interferons INF- $\gamma$  and INF- $\alpha$  in patients receiving Amiksin increased respectively by 2.3 and 2.1 times in comparison with the original and comparable to the level of healthy subjects, indicating that the normalizing inductive effect of the drug on a balanced production of interferons and allows the use of Amiksin in the treatment of multiple skin papillomas.

*Key words:* multiple skin papillomas, amiksin, relapses, interferons.

## РЕГЕНЕРАТОРНО-РЕПАРАТИВНЫЕ И АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ПРЕПАРАТА «CELLGEL» В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Суховой Ю. Г.<sup>1</sup>, Костоломова Е. Г.<sup>1</sup>, Цирятъева С. Б.<sup>2</sup>,  
Аргунова Г. А.<sup>2</sup>, Унгер И. Г.<sup>1</sup>, Гольцов С. В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ООО НПО «Тюменькриобанк»; <sup>2</sup>ГБОУВПО Тюменская Государственная Медицинская Академия, Тюмень, Россия

Проблема лечения инфицированной раны не теряет своей актуальности и в настоящее время. Продолжается поиск средств. Основная проблема в том, чтобы применение препарата было возможно и целесообразно в любую фазу раневого процесса. Препарат «Cellgel» позволяет решить эти проблемы, кроме того значительно ускоряет заживление раны без образования грубого рубца. Наличие антибактериального эффекта дает возможность использовать его при условиях инфицированной раны.

*Ключевые слова:* лечение инфицированной раны, репарация, антибактериальный эффект, препарат «Cellgel».

Необходимость в создании препаратов, обладающих одновременно антибактериальным и репаративным эффектом, остается актуальной и сегодня. Заживление раны – это сложный биологический процесс, включающий фазы воспаления, реэпителизации, образования грануляционной ткани и реорганизации внеклеточного матрикса [4]. Одним из важнейших условий этого процесса является нейтрализация и элиминация патогенов, всегда проникающих в рану.

«Cellgel» – препарат, являющийся результатом сорбции на биополимере (гидроксиэтил-целлюлоза) коктейля биологически активных молекул, продуцируемых клетками куриного эмбриона. Экспериментальные работы с раз-

личными вариантами данного препарата, показали, что он обладает антибактериальной и репаративной активностью. В последующем запатентованный препарат «Cellgel» (Патент № 2011141622 от 13.10.2011) был исследован в условиях эксперимента.

**Цель исследования** – изучить антибактериальные свойства препарата «Cellgel» и его влияние на динамику заживления гнойной инфицированной раны.

**Материалы и методы.** Эксперимент выполнен на 80 половозрелых кроликах – самцах. Содержание и экспериментальные процедуры проводились в соответствии с правилами Совета Европейского сообщества (Директива 86/309/ЕЕС от 24.11.1986). Использовалась

модель инфицированной раны мягких тканей. (Патент № 2006122640 от 23.06.2006). Через 3 суток некротический струп удаляли механическим путем и в рану вносили 500 тыс. КОЕ *S. aureus*. Лечение животных начинали через 5 суток после формирования инфицированной раны мягких тканей.

Животные были разделены на 4 группы: экспериментальная группа и три группы контроля (по 20 кролов в каждой). В каждой группе 1 раз в сутки выполняли перевязку с определенным для каждой группы лекарственным веществом.

1. «Экспериментальная группа» на рану наносили препарат «Cellgel».
2. Группа «Контроль основы» на рану наносили только основу геля.
3. Группа контроля «Традиционное лечение» лечение проводили в зависимости от фазы течения раневого процесса: в фазу воспаления применяли повязки с мазями на водной основе, в фазу регенерации и эпителизации – с мазями на жировой основе.
4. Группа контроля «Без лечения».

На 1, 3, 5, 7, 10, 15 сутки оценивали размеры раневого дефекта, наличие отека, гиперемии, отделяемого из раны и его характер. В эти же сроки под местной анестезией выполняли биопсию раны через все слои на глубину до 1.8–2.2 см. Материал фиксировали в 96% этиловом спирте, заливали в парафин и готовили гистологические срезы, которые окрашивали гематоксилином Майера и эозином с последующим анализом морфологической картины [1, 2].

Антибактериальная активность оценивалась по общепринятой методике «Определение чувствительности микробов к антибиотикам методом диффузии в агар с применением бумажных дисков» [3].

**Результаты исследования.** Получены следующие результаты:

Диаметры зон подавления роста *S. aureus* 155 препаратом «Cellgel», ( $32,7 \pm 2,1$  мм) достоверно больше «Гентамицина сульфата» ( $23,1 \pm 1,8$  мм соответственно). Гель также обладает высокой активностью в отношении *E. coli* 2290 и *B. cereus* Jp 5832.

У всех животных были сформированы раны неправильно округлой формы 3.9–4.1 см в диаметре. Глубина раневого дефекта достигает 2 см. Вокруг раны очаг инфильтрации до 3.5 см в диаметре. Стенки раны гиперемированы, плотные, спаяны с окружающими тканями,

дно покрыто плотным налетом фибрина, выделяется до 2–3 мл гнойного отделяемого белесоватого цвета тестоватой консистенции.

При гистологическом исследовании определяются очаги некроза в соединительной и мышечной ткани, расширение кровеносных сосудов со стазом крови, экссудация лейкоцитов. Сосочковый слой дермы имеет четкое разграничение на слои: с выраженной клеточной инфильтрацией, представленной моноцитами, единичными макрофагами и рыхлой соединительной тканью с большим количеством фиброцитов, единичными фибробластами, единичными моноцитами, плазмоцитами.

На 1 сутки в экспериментальной группе раневой дефект сохраняет свои размеры ( $4 \pm 0.5$  см в диаметре). Вокруг раны сохраняется умеренная гиперемия кожи, стенки раны мягкие при пальпации, дно раны покрыто налетом фибрина, гноя нет. На 3 сутки наблюдается уменьшение размеров дефекта ткани до 0.2–0.3 мм в диаметре, рана покрыта струпом бледно – серого цвета, вокруг располагается очаг эпителизации до 2.5–3.0 мм в диаметре. Гиперемия и инфильтрация вокруг раны не определяется. При гистологическом исследовании в ране определяется рыхлая соединительная ткань с небольшой лейкоцитарной инфильтрацией, единичными укрупненными фибробластами, лимфоцитами, плазмоцитами, эозинофилами и моноцитами. Очаги пролиферации эндотелия сосудов без просвета, с многорядностью расположения ядер. На 5 сутки дефект кожи отсутствует, определяется очаг эпителизации до 2 см в диаметре. Микроскопически поверхность покрыта многослойным плоским эпителием, подэпителиально определяется лимфоплазмоцитарная инфильтрация.

На 10–15 сутки эксперимента констатирована полная эпителизация раневого дефекта с его оволосением. Гистологически отмечается пролиферативная активность клеток фибробластического ряда, трубчатая пролиферация фибробластов и эндотелия сосудов. В подкожной клетчатке определяются неповрежденные нервные стволы, что соответствует гистологической картине эпителизации раны с сохранением всех функционирующих структур.

Во всех группах контроля на 1 сутки раны сохраняют свои размеры. При этом стенки ран сохраняют свою плотность, спаяны с окружающими тканями, вокруг раны сохраняется

плотный инфильтрат, при механическом воздействии из раны выделяется гной, дно раны покрыто гнойной пленкой.

У животных 2 группы раны сохраняют свои размеры до 10 суток эксперимента, рана покрыта налетом фибрина, края и стенки раны плотные. При гистологическом исследовании определяется отек, лимфогистиоцитарная инфильтрация и дистрофически-дегенеративные изменения подкожной клетчатки, мышечного слоя. Закрытие раневого дефекта 22-25 суткам эксперимента не происходит.

В группе 3 в течение раневого процесса прослеживаются все фазы: экссудации, пролиферации и регенерации. Закрытие раневого дефекта происходит к 20-25 суткам с формированием грубого соединительно – тканного рубца, гистологически в эти сроки сохраняются дистрофически- дегенеративные изменения подкожной клетчатки и мышц, дегенеративные изменения нервных стволиков.

В группе 4 у 5 животных на 5-10 сутки развилась флегмона подкожной клетчатки, что привело к гибели животных. У оставшихся животных мы не смогли добиться закрытия раневого дефекта к 25-30 суткам эксперимента, и животные были выведены из эксперимента.

На наш взгляд, значительное (в 5 раз) ускорение очищения раны в первую фазу раневого процесса в экспериментальной группе по сравнению с группами контроля, а также эпителизация раны без образования соединительнотканного рубца с восстановлением функции поврежденного участка (рост волосяного покрова) характеризуют потенцирование препаратом «Цельгель» механизмов физиологической репаративной регенерации.

Клинический эффект применения препарата «Цельгель» позволяет сделать вывод о его потенцирующем влиянии на течение процессов репаративной регенерации.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гистологическая техника: Учебное пособие / Под редакцией В. В. Семченко, С. А. Барашкова, В. Н. Ноздрина, В. Н. Артемьева. – Омск-Орёл: Омская областная типография, 2006.
2. Принципы и методы гистохимического анализа в патологии, под ред. А. П. Авцына и др., Л., 1971, библиогр.
3. Bauer A. W., Kirby W. M. M., Sherris J. C., Turck M // Am. J. Clin. Path. – 1966. – Vol. 45. – P. 493-496.
4. Singer A. J., Clark R. A. F. Cutaneous wound healing // New Engl. J. Med. – 1999. – Vol. 341. – P. 738-746.

### REGENERATIVE AND REPARATIVE ANTIBACTERIAL CHARACTERISTICS OF THE DRUG «CELLGEL» IN EXPERIMENT

Sukhovey J. G.<sup>1</sup>, Kostolomova E. G.<sup>1</sup>, Tsyryateva S. B.<sup>2</sup>,  
Argunova G. A.<sup>2</sup>, Unger I. G.<sup>1</sup>, Goltsov S. V.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Scientific production Association «Tyumen Cryo Bank»; <sup>2</sup>Tyumen State Medical Academy, Tyumen, Russia

The problem of treatment of infected wounds does not lose its relevance in the present time. The means are continued being searched for. The main problem is to develop such a drug that will be effective and rational at any phase of wound healing. The drug "Cellgel" allows to solve these problems, in addition it significantly accelerates wound healing without the formation of rough scar. The antibacterial effect gives the opportunity to use it for curing the infected wounds.

## АКТИВНОСТЬ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ И ЧЕРЕПНО-МОЗГОВАЯ ТРАВМА: НАРУШЕНИЯ И ПОДХОДЫ К КОРРЕКЦИИ

Филатенкова Т. А., Дмитриенко Е. В., Шанин С. Н.,  
Фомичева Е. Е.

Федеральное Государственное Бюджетное Научное Учреждение «Институт  
Экспериментальной Медицины», Санкт-Петербург, Россия

Исследовали изменение показателей активности иммунной системы и когнитивных функций крыс после экспериментальной ЧМТ. В качестве модели ЧМТ использовали модель «падающего груза». Показано, что ЧМТ вызывала активацию клеток микроглии, значительно увеличивала экспрессию гена TNF- $\alpha$  в культуре микроглии, Цитотоксическая и пролиферативная активности лимфоцитов, увеличены у животных после ЧМТ, нарушена пространственная память. Внутривentricularное введение Дерината приводило к нормализации практически всех исследованных защитных реакций.

*Ключевые слова:* ЧМТ, иммунная система, иммунная система мозга.

Черепно-мозговая травма (ЧМТ) является одной из наиболее значимых проблем современного здравоохранения. Первичная травма мозга может быть вызвана множеством способов, среди которых и ушиб мозга, и сжатие/растяжение тканей. Последствия ЧМТ различны: изменения личности, когнитивных способностей, нарушения функций двигательной и иммунной систем [1, 2, 3].

Целью настоящей работы явилось изучение изменений показателей активности иммунной системы и иммунной системы мозга крыс, а также когнитивных функций животных после экспериментальной ЧМТ и возможности коррекции выявленных нарушений препаратом нуклеотидной природы Деринат.

Работа выполнена на крысах-самцах породы Wistar. В качестве модели механической травмы головного мозга использовали модель «падающего груза» (3). Перед нанесением травмы животные получали CO<sub>2</sub> наркоз. Активность иммунной системы анализировали по изменению цитотоксической и пролиферативной активности спленоцитов методом флюориметрии, изменение уровня экспрессии гена цитокина TNF- $\alpha$  в гипоталамусе и коре головного мозга в опытах *in vitro* и *in vivo* методом РВ-ПЦР, экспрессия кальций-связывающего белка Iba-1 – методом иммуногистохимического окрашивания. Изменение когнитивных функций мозга

показано в водном лабиринте Морриса Данные траектории движения получены автоматически с использованием программного обеспечения VideoMot2 (TSE Systems, Germany). Деринат вводили внутривentricularно в дозе 10 мг/кг массы в 0,5 мл физраствора. Контрольные животные получали 0,5 мл физраствора.

Показано что степень экспрессии гена цитокина TNF- $\alpha$  в культуре клеток первичной микроглии не изменялась под действием АТФ в физиологической концентрации 50 мкМ. Однако добавление АТФ в концентрации 1 мМ, соответствующей концентрации АТФ во внеклеточном пространстве при ЧМТ, значительно увеличивало экспрессию гена TNF- $\alpha$  в культуре клеток первичной микроглии. В экспериментах *in vivo* был проведен сравнительный анализ изменения степени экспрессии гена TNF- $\alpha$  в гипоталамусе и коре головного мозга крыс после экспериментальной ЧМТ. В гипоталамусе мозга степень экспрессии этого гена достоверно повышалась на первые сутки и постепенно снижалась, достигая величины этого показателя у контрольных животных лишь к 14-м суткам. В коре головного мозга – в области мозга непосредственно страдающей от механической удара, степень экспрессии гена TNF- $\alpha$  снижалась в первый день, однако уже к 7-му дню повышалась, достигая уровня экспрессии гена этого цитокина у контрольных животных.

Активированная микроглия интенсивно экспрессирует кальций-связывающий белок (ионизирующая кальций-связывающая адаптерная молекула 1, Iba-1) (5). ЧМТ вызывала активацию клеток микроглии в коре головного мозга крыс на 7-е сутки, что выразилось повышением степени экспрессии Iba-1, в то время как на 14-е сутки интенсивность экспрессии этого белка снижалась по сравнению с этим показателем у контрольных животных, что свидетельствует об изменении активности микроглиальных клеток в посттравматический период.

Модель ЧМТ приводила к стимуляции цитотоксической активности спленоцитов на 3-и сутки после травмирующего воздействия и оставалась повышенной в течение 14-дневного периода наблюдения. Также после нанесения экспериментальной ЧМТ в течение всего посттравматического периода наблюдалось повышение интенсивности пролиферации спленоцитов в ответ на сочетанное действие IL-1 $\beta$  и Кон А.

Анализ наиболее характерных траекторий движения крыс в водном лабиринте Морриса на 7-е сутки после ЧМТ, показал, что у животных существенно нарушена пространственная память, о чем свидетельствовало уменьшение времени (в процентном соотношении), проведенного в секторе интереса, по сравнению с контрольными животными ( $P < 0,05$ ), время, требуемое для достижения сектора-платформы, увеличено. После нанесения ЧМТ было выявлено изменение показателей защитных функций организма на системном и клеточно-молекулярном уровнях, что свидетельствует о нарушениях функций иммунной системы. Анализ этих изменений показал, что некоторые защитные реакции восстанавливаются в течение периода наблюдения (14 дней), другие – нет. Для индукции восстановления защитных функций организма, был использован препарат нуклеотидной природы – Деринат.

Внутрибрюшинное введение Дерината приводило к нормализации практически всех исследованных защитных реакций, эти изменения достоверны по сравнению с теми же показателями у животных контрольной группы с ЧМТ, получавших физраствор. Так, цитотоксическая и пролиферативная активности, значительно увеличенные у травмированных животных, под влиянием Дерината нормализовались, т.е. курсовое введение Дерината предотвращало длительную излишнюю сти-

муляцию клеток иммунной системы. Введение препарата нуклеотидной природы крысам вызывало повышенную активацию клеток микроглии по сравнению с уровнем их активации после ЧМТ у животных, не получавших Деринат как на 7-й, так и на 14-й день. Поскольку, клетки микроглии при нейротравме могут экспрессировать и продуцировать как нейропротекторные, так и нейротоксичные медиаторы – это может иметь протективное значение для клеток головного мозга. (4) У животных после ЧМТ степень экспрессии гена фактора некроза опухолей  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), м под влиянием сочетанного действия АТФ и препарата нуклеотидной природы в обеих концентрациях 150 мкг и 1,5 мкг восстанавливалась до базального уровня. В опытах *in vivo* введение Дерината существенно снижало этот показатель в гипоталамусе уже на первый день после нанесения травмы, а в коре головного мозга, наоборот, повышало, практически нормализуя его. Также курсовое введение Дерината восстанавливало до исходного уровня все нарушенные показатели пространственной памяти. Таким образом, в настоящей работе была показана комплексная активация периферической иммунной системы и иммунной системы мозга. Как угнетение обеих систем, так и их излишняя активация могут привести к нежелательным последствиям для всего организма после перенесенной травмы. Возможность медикаментозно нормализовать активность этих систем имеет важное значение для предотвращения развития вторичных неврологических и иммунных патологий. Как известно, препарат нуклеотидной природы Деринат осуществляет свое действие через пуриnergические P2 рецепторы, экспрессированные на поверхности различных клеток, в том числе клеток иммунной и нервных систем, чем, по-видимому, и обусловлен терапевтический эффект Дерината после ЧМТ.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. McAllister T.W. // Dialogues Clin. Neurosci. – 2011. – V.13, N3. – P. 287-300.
2. Шевченко К. В., Четвертных В. А., Кравцов Ю. И. // Иммунология. – 2009. – Т. 30, № 3. – С. 180-184.
3. Рыбакина Е. Г., Шанин С. Н., Фомичева Е. Е., Филатенкова Т. А., Дмитриенко Е. В. // Медицинский Акад. Журн. 2014. Т. 14, № 4. С. 55-62.
4. Loane D. J., Byrnes K. R. // Neurotherapeutics 2010. 7 (4). P.366-377.



## ACTIVITY OF IMMUNE SYSTEM AND TRAUMATIC BRAIN INJURY: DISTURBANCE AND WAYS FOR ITS CORRECTION

Filatenkova T. A., Dmitrienko E. V., Shanin S. N., Fomicheva E. E.

Federal State Budgetary Scientific Institution "Institute of Experimental Medicine" (FSBSI "IEM"),  
Saint-Petersburg, Russia

Changes of immune system's activity and cognitive functions of rats were researched after TBI. As a model of TBI the "weight-drop" model was used. TBI caused the activation of microglial cells, increased the expression of TNF- $\alpha$  in microglial cell culture. Cytotoxicity and proliferating activity of lymphocytes of rats with TBI were increased; cognitive functions also were disturbed. Intraperitoneal injection of Derinat caused normalization practical all of protective functions.

*Key words:* TBI, immune system, immune system of brain.

---

## ИММУННЫЙ СТАТУС ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ ИШЕМИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА: КОРРЕКЦИЯ НАРУШЕНИЙ

Шульгинова А. А.<sup>1</sup>, Караулов А. В.<sup>2</sup>, Конопля А. И.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ГБОУ ВПО Курский государственный медицинский университет, Курск;

<sup>2</sup>ГБОУ ВПО Первый Московский государственный медицинский университет  
им. И. М. Сеченова, Москва, Россия

У больных с хронической ишемией мозга на фоне гипертонической болезни II стадии до начала стандартного лечения в плазме крови установлено значительное повышение концентрации цитокинов: ИНФ- $\gamma$ , ИЛ-2, ИЛ-17, провоспалительных (ФНО, ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-18) с одновременным повышением противовоспалительных ИЛ-4 и ИЛ-10 при неизменном содержании РАИЛ. Кроме этого, выявлено повышение уровня С<sub>5</sub>, С<sub>5a</sub>, снижение содержания С<sub>3</sub>, С<sub>4</sub>-компонентов системы комплемента и всех исследованных классов иммуноглобулинов (IgM, IgG, IgA) при неизменной концентрации, по сравнению с контрольной группой, фактора Н, С<sub>1</sub>-ингибитора и С<sub>3a</sub> компонента. Наибольшей клинико-иммунологической эффективностью в отношении выявленных клинических и лабораторных нарушений обладает сочетание актовегин и церетон, наименьшей – применение церебролизина и мексидола, промежуточной – использование эмоксипина и пирацетама.

*Ключевые слова:* иммунный статус, хроническая ишемия головного мозга.

**Актуальность.** Цереброваскулярные расстройства представляют собой одно из наиболее распространенных патологических состояний в неврологической практике. Недостаточность мозгового кровообращения закономерно возникает при атеросклерозе магистральных артерий головы, гипертонической болезни и иных заболеваниях сердечно-сосудистой системы [1, 4]. Одно из центральных мест в изучении цереброваскулярной патологии занимает проблема лечения больных с хронической ишемией головного мозга (ХИМ), в клинической картине которой основную роль играют прогрессирующие когнитивные нарушения. Иммунное воспа-

ление и нарушение липидного обмена приводят к необратимому повреждению фосфолипидных мембранных комплексов и деструктивному процессу в нейроглии, что является одной из причин клинических проявлений ХИМ. Это диктует необходимость оптимизации лечения таких больных применением наиболее эффективных сочетаний ноотропных и антиоксидантных препаратов [2, 3, 5].

**Цель работы.** Установление иммунных нарушений и выявление эффективности использования фармакотерапии, включающей комбинацию препаратов ноотропного и антиоксидантного действия у пациентов с ХИМ.

**Используемые методы.** Анализу подвергнуты результаты лечения 57 пациентов со II стадией ХИМ на фоне гипертонической болезни II стадии, которые были поделены на 3 группы, получавшие комплексную базовую и дополнительную терапию парными сочетаниями ноотропных и антиоксидантных препаратов. Иммунные нарушения оценивали по уровню в плазме крови цитокинов (ФНО, ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-18, ИЛ-4, ИЛ-10, рецепторного антагониста ИЛ-1 (РАИЛ), ИНФ $\gamma$ , ИЛ-2, ИЛ-17), компонентов комплемента (C<sub>3</sub>, C<sub>3a</sub>, C<sub>4</sub>, C<sub>5</sub>, C<sub>5a</sub>), ее ингибиторов (фактора Н, C<sub>1</sub>-ингибитора), иммуноглобулинов классов М, G, А.

**Основные результаты.** До начала лечения в плазме крови больных ХИМ установлено значительное повышение концентрации цитокинов: ИНФ $\gamma$ , ИЛ-2, ИЛ-17, провоспалительных (ФНО, ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-18) с одновременным повышением противовоспалительных ИЛ-4 и ИЛ-10 при неизменном содержании РАИЛ. Также выявлено повышение уровня C<sub>5</sub>, C<sub>5a</sub>, снижение содержания C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>-компонентов системы комплемента и всех исследованных классов иммуноглобулинов (IgM, IgG, IgA) при неизменной концентрации, по сравнению с контрольной группой, фактора Н, C<sub>1</sub>-ингибитора и C<sub>3a</sub> компонента. Введение в схему лечения церебролизина и мексидола нормализовало уровень C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>-компонентов комплемента и IgG, снижало концентрацию ФНО, ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-18, ИЛ-4, ИЛ-17, C<sub>5</sub>-компонента комплемента, повышало содержание IgA, ИЛ-10 и РАИЛ. При использовании эмоксипина и пирacetама отмечена нормализация уровня ИЛ-17, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>-компонентов комплемента и IgG, коррекция содержания ФНО,

ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-18, ИНФ $\gamma$ , ИЛ-2, C<sub>5</sub>, C<sub>5a</sub>-компонентов комплемента, IgA и М, повышение концентрации противовоспалительных цитокинов ИЛ-4, ИЛ-10, РАИЛ, C<sub>1</sub>-ингибитора и фактора Н, активность каталазы. Аналогичные, но более выраженные корригирующие эффекты на показатели иммунного статуса оказывала комбинация актовегин и церетон.

На основании исследования пациентов с ХИМ при поступлении в клинику изменения иммунных показателей прямо или косвенно свидетельствует о наличии иммунного воспаления. Наибольшей эффективностью обладает сочетание актовегин и церетон, наименьшей – применение церебролизина и мексидола, промежуточной – использование эмоксипина и пирacetама. Сравнивая результаты лабораторных изменений на фоне различных схем фармакотерапии с клиническими данными, установлено их совпадение. Своевременно начатое лечение, особенно использование сочетания актовегина и церетона, может на долгие годы сохранить профессиональную, социальную и бытовую адаптацию больных ХИМ, улучшить прогноз в отношении продолжительности жизни.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Захаров В. В. Русский медицинский журнал – 2009. – № 2. – С. 140-144.
2. Косарев В. В., Бабанов С. А. Медицинский совет. – 2012. – № 3. – С. 54-59.
3. Левин О. С. Современная терапия в психиатрии и неврологии. – 2012. – № 3. – С. 40-46.
4. Пёхова К. А., Михин В. П., Гаврилюк Е. В., Конопля А. И. Вестник новых медицинских технологий. – 2012. – XIX, № 1. – С. 172-173.
5. Ярилин А. А. Иммунология. – М.: 2010. – 620 с.

## THE IMMUNE STATUS AT THE CHRONIC ISCHEMIA OF THE BRAIN: CORRECTION OF DISTURBANCES

Shulginova A. A.<sup>1</sup>, Karaulov A. V.<sup>2</sup>, Konoplya A. I.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Kursk state medical university, Kursk; Russia

At patients with a chronic ischemia of a brain against an idiopathic hypertension of the II stage prior to standard treatment in a blood plasma substantial increase of concentration of cytokines is established: INF $\gamma$ , IL-2, IL-17, pro-inflammatory (FNO, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-18) with simultaneous rising of antiinflammatory IL-4 and IL-10 at not changed maintenance of RAIL. Besides, rising of the C5 level, C5a, depression of the maintenance of C3, C4 components of system of a complement and all studied classes of immunoglobulins is taped (IgM, IgG, IgA) at not changed concentration, in comparison with control group, a H factor, C1 inhibitor and C3a a component. The greatest clinic and immunologic efficiency concerning the taped clinical and laboratory disturbances the combination Aktovegin and Cereton, the smallest – application of Cerebrolysinum and Meksidol, intermediate – use of an Emoksipin and Pyracetamum possesses.

*Keywords:* chronic ischemia of a brain, immune disturbances.

## ОЦЕНКА ВОЗМОЖНОСТИ КОМБИНИРОВАННОГО ПРИМЕНЕНИЯ БИС [3- (4-ХЛОРФЕНИЛ)-1- (4-МЕТИЛФЕНИЛ)КАРБОКСАМИДО-1,3-ПРОПАНДИОНАТО] ОКСОВАНАДИЯ С ИММУНОКОРРЕКТОРАМИ

Юшкова Т.А., Краснова А.И., Пулина Н.А.

ГБОУ ВПО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Пермь, Россия

Изучена гипогликемическая активность комбинированного применения бис[3- (4-хлорфенил)-1-(4-метилфенил)карбоксамидо-1,3-пропандионато] оксованадия с Ликопидом® и Имунориксом® в сравнении с метформином. Выявлено потенцирование сахароснижающего эффекта при введении оксованадиевого комплекса с Имунориксом.

*Ключевые слова:* гипогликемическая активность, оксованадиевый комплекс, Ликопид, Имунорикс.

Известно, что в сложном механизме развития сахарного диабета (СД) и 1-го и 2-го типов участвуют как клеточные, так и гуморальные звенья иммунитета. На данный момент клиническая эффективность лечения СД, зачастую, достигается комбинированным применением гипогликемических препаратов, имеющих разный механизм действия, а также комбинациями антидиабетических средств с препаратами других фармакологических групп, влияющих на разные звенья патогенеза заболевания. Особый интерес может представлять комбинированное применение гипогликемических соединений с иммунокорректирующими средствами. Перспективность подобной терапии связана с возможностью влияния иммунокорректоров на иммунопатологические процессы заболевания [1].

Ранее нами был получен оксованадиевый комплекс (ОВК) – бис[3-(4-хлорфенил)-1-(4-метилфенил)карбоксамидо-1,3-пропандионато]оксованадий, у которого были обнаружены гипогликемические и иммуностропные свойства [2, 3]. Представляло интерес изучить влияние комбинированного применения ОВК с иммунокорректорами – пидотимодом (Имунорикс®), глюкозаминилмурамилдипептидом (Ликопид®) на уровень глюкозы при аллоксан-индуцированном сахарном диабете.

**Цель работы** – изучение гипогликемической активности комбинированного применения бис [3-(4-хлорфенил)-1-(4-метилфенил)

карбоксамидо-1,3-пропандионато]оксованадия с Ликопидом® и Имунориксом®.

**Материалы и методы.** Экспериментальную гипергликемию моделировали внутрибрюшинным введением аллоксана тригидрата («Alfa Aesar®») в дозе 170 мг/кг [4]. Эксперименту подвергали животных, у которых развивалась острая гипергликемия через 72 часа после введения диabetогена. Критерием включения животных в эксперимент служил уровень глюкозы в крови в пределах 15-19 ммоль/л. ОВК вводили в виде взвеси в 2% крахмальном растворе в дозе 25 и 50 мг/кг, пидотимод и глюкозаминилмурамилдипептид вводили в виде водных растворов в дозах, обеспечивающих проявление иммуномодулирующего эффекта, – 11 мг/кг и 0,14 мг/кг соответственно. При комбинированном применении хелата с иммунокорректорами ОВК вводили в дозе, равной половине изначальной скрининговой дозы (0,25 мг/кг).

Концентрацию глюкозы в крови животных определяли глюкозооксидазным методом через 30 и 120 минут после введения исследуемых веществ. Степень гипогликемической активности соединений сравнивали с активностью субстанции-порошка метформина гидрохлорида (ОАО «Фармакон») в дозе 50 мг/кг.

Результаты обработаны статистически с использованием парного t-критерия Стьюдента при помощи программ Windows XP (Excel) с предварительной проверкой выборки на нормальность распределения. Результаты представлены в виде  $M \pm m$  (M – среднее значение,

m – средняя арифметическая ошибка). Различия считали достоверными при уровне  $p < 0,05$ .

**Результаты и обсуждение.** Для оценки возможности потенцирования сахароснижающего эффекта исследуемого металлокомплекса ОВК при комбинированном применении с иммунокорректорами, нами предварительно была изучена гипогликемическая активность Ликопида® и Имунорикса®. Изучение иммунокорректирующих средств при монотерапии показало, что Ликопид не оказывал достоверного гипогликемического действия у крыс с экспериментальным СД, а Имунорикс проявил гипогликемическую активность слабой степени выраженности на 2-м часе наблюдения – процент торможения гипергликемии составил  $20,8 \pm 2,1$  ( $P < 0,05$ ).

Результаты предварительного изучения антидиабетических эффектов иммунокорректоров показали безопасность их применения для комбинации с ОВК, ввиду отсутствия предпосылок развития ярко выраженных гипогликемических состояний при комбинированном приеме. Учитывая результаты предварительного изучения антидиабетических эффектов иммунокорректоров при монотерапии, нами было выдвинуто предположение, что применение комбинации высокоактивного гипогликемического хелата ОВК с иммунокорректорами даст возможность снизить дозу органического вещества без ухудшения показателей гликемии.

Исследования показали, что в случае комбинирования ОВК (в дозе равной  $\frac{1}{2}$  скрининговой дозировки) с Ликопидом (в дозе  $0,14$  мг/кг) гипогликемическое действие комбинации проявлялось только на 2-м часе наблюдения. Процент торможения гипергликемии составил  $37,9 \pm 3,1$  ( $P < 0,05$ ). При этом, по выраженности эффекта комбинация не превосходила активность ОВК в дозах  $25$  мг/кг и  $50$  мг/кг,

а также эффекта субстанции антидиабетического препарата – метформина.

При введении ОВК в комбинации с Имунориksom был отмечен достоверный гипогликемический эффект, причем по выраженности гипогликемического действия указанная комбинация в  $1,8$ – $2,6$  раза ( $P < 0,05$ ) превосходила эффект металлокомплекса в дозе  $25$  мг/кг, в  $1,1$  раза ( $P < 0,05$ ) – эффект данного хелата в дозе  $50$  мг/кг, а также эффект метформина – в  $1,1$ – $1,4$  раза ( $P < 0,05$ ). Степень снижения уровня глюкозы составила  $50,1 \pm 4,2\%$  и  $74,4 \pm 5,1\%$  на  $30$  минутах и  $2$ -м часе опыта соответственно.

Таким образом, наиболее выраженный эффект потенцирования гипогликемической активности наблюдался при комбинировании ОВК и пидотимода (Имунорикса®). Полученные результаты подтверждают целесообразность включения иммунокорректоров в комбинированную терапию СД. Это обуславливает необходимость дальнейших углубленных исследований высокоактивного металлокомплекса бис[3-(4-хлорфенил)-1-(4-метилфенил)карбоксамидо-1,3-пропандионато]оксованадия, а также его композиции с Имунориksom, с целью создания эффективных и безопасных антидиабетических средств.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Д. Н. Лаптев, Проблемы эндокринологии, 2009, Т. 55, № 4, 24-33.
2. Н. А. Пулина, Т. А. Юшкова, А. И. Краснова, В. В. Юшков, Вестник РУДН. Сер. Медицина, 2010, № 4, 423-425.
3. Юшкова Т. А., Краснова А. И., Пулина Н. А. Российский иммунологический журнал, 2014, Т. 8, № 3, 758-760.
4. А. Н. Миронов (ред.), Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств, Гриф и К, Москва, 2012.

### ASSESSMENT OF POSSIBILITY OF THE COMBINED USE OF BIS[3-(4-(CHLORPHENYL)-1-(4-METHYLPHENYL) CARBOXAMIDO-1,3-PROPANDIONATO]OXOVANADIUM WITH IMMUNOCORRECTORS

Yushkova T. A., Krasnova A. I., Pulina N. A.

Perm state pharmaceutical academy, Perm, Russia

Hypoglycemic activity of the combined use of bis[3-(4-(chlorphenyl)-1-(4-methylphenyl)carboxamido-1,3-propandionato]oxovanadium with Licopid® and Imunorix® compared to metformin was studied. Potentiation of hypoglycemic effect on administering a complex of oxovanadium with Imunorix was revealed.

*Key words:* hypoglycemic activity, complex of oxovanadium, Imunorix®, Licopid®.

## ПРОИЗВОДНЫЕ 3-ПИРРОЛИН-2-ОНОВ В РЕГУЛЯЦИИ ФАГОЦИТАРНОЙ АКТИВНОСТИ ЛЕЙКОЦИТОВ

Гейн О. Н., Гейн В. Л.

ГБОУ ВПО «Пермская государственная фармацевтическая академия»  
Пермь, Россия

Среди веществ органического синтеза особое место занимают производные 3-пирролин-2-онов, проявляющие различные виды биологической активности, а также являющиеся перспективными в исследовании на иммунобиологическую активность. Установлено, что исследуемые соединения РАН-42, ГКН-593, ММ-4, ММ-12 проявляли разнонаправленное действие на фагоцитарную активность лейкоцитов периферической крови крыс: вещества ММ-4 и РАН-42 главным образом стимулировали поглотительную активность лейкоцитов, вещества ММ-12 и ГКН-593 оказывали преимущественно угнетающее действие.

*Ключевые слова:* фагоцитоз, 3-пирролин-2-онов, иммунобиологическая активность.

**Введение.** Среди веществ органического синтеза особое место занимают производные 3-пирролин-2-онов, проявляющие различные виды биологической активности, и относящиеся к классу нетоксичных веществ [1, 2]. Как было показано ранее, данный ряд соединений является перспективным и в исследовании на иммунобиологическую активность [5]. В продолжение изучения иммунобиологической активности данного ряда соединений, нами были взяты новые вещества: РАН-42 и ГКН-593, проявляющие противовоспалительную активность, и ММ-4, ММ-12, обладающие анальгетической активностью [4].

**Целью настоящей работы** явилось изучение соединений РАН-42, ГКН-593, ММ-4, ММ-12 на фагоцитарную активность лейкоцитов периферической крови крыс.

**Материалы и методы.** Эксперимент в системе *in vivo* проведен на белых нелинейных половозрелых крысах массой 180-200 г. Все исследования проводились в соответствии с международным соглашением об экспериментах на животных. Исследуемые вещества (РАН-42, ГКН-593, ММ-4, ММ-12) вводили животным внутривенно в дозе 100 мг/кг в 2% крахмальной слизи. Образцы крови забирали из сосудов хвоста до введения исследуемых веществ (контроль), а также через 1 час после введения вещества. Для определения фагоцитарной активности лейкоцитов периферической крови за основу брали метод В. Н. Каплина в модификации [3].

Полученные данные обрабатывали методами математической статистики с помощью *t*-критерия Стьюдента.

**Результаты.** В результате проведенных исследований установлено, что исследуемые соединения ММ-12 и РАН-42 изменяли суммарную фагоцитарную активность лейкоцитов периферической крови крыс по таким показателям, как фагоцитарное число (количество объектов фагоцитоза, приходящееся на фагоцит) и процент фагоцитоза (количество клеток, захватившие объекты фагоцитоза). Вещество ММ-12 приводило к угнетению фагоцитарной активности лейкоцитов по такому показателю как процент фагоцитоза, а вещество РАН-42, напротив, оказывало стимулирующее влияние на фагоцитарную активность лейкоцитов по обоим показателям.

При дифференцированном анализе изменений фагоцитарной активности лейкоцитов, выявлено преимущественное влияние исследуемых соединений на изменения нейтрофильного и моноцитарного фагоцитоза. Влияние преимущественно на фагоцитарную активность нейтрофилов оказывали соединения ММ-4, РАН-42. На фоне введения ММ-4 отмечено стимуляция нейтрофильного фагоцитоза по такому показателю, как процент фагоцитоза. Соединение РАН-42 приводило к стимуляции нейтрофильного фагоцитоза по обоим исследуемым показателям. Преимущественное изменение фагоцитарной активности моноцитов крови отмечено на фоне вве-

дения таких веществ, как ММ-12 и ГКН-593. Оба соединения приводили к снижению фагоцитарной активности моноцитов периферической крови крыс: ММ-12 по обоим изучаемым показателям, ГКН-593 вызывало снижение процента моноцитарного фагоцитоза. На изменения поглотительной активности эозинофилов исследуемые соединения влияния не оказывали.

**Заключение.** Таким образом, исследуемые соединения РАН-42, ГКН-593, ММ-4, ММ-12 проявляли разнонаправленное действие на фагоцитарную активность лейкоцитов периферической крови крыс: вещества ММ-4 и РАН-42 главным образом стимулировали поглотительную активность лейкоцитов, ве-

щества ММ-12 и ГКН-593 оказывали преимущественно угнетающее действие.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Шуклина Н. С., Колла В. Э. // Рациональное использование лекарств: Тез. докл. Российской науч. практ. конф. – Пермь, 2000. – С. 60-61.
2. Гейн В. Л., Гейн Л. Ф., Поросева Н. Ю. и др. // Хим. – фарм. журн. – 1997. – № 5. – С. 33-36.
3. Шилов Ю. И. // Пермский медицинский журнал. – 1998. – Т. 15, № 2. – С. 3-9.
4. Гейн В. Л., Марьясов М. А., Сирина Т. А., Махмудов Р. Р. // Хим. – фарм. журн. – 2013. – Т. 47, № 10. – С. 33-37.
5. Гейн О. Н., Пашова К. Г., Гейн В. Л., Марьясов М. А. // Российский иммунологический журнал – 2014. – том 8 (17), № 3 – С. 657-659.

### 3-PYRROLINE-2-ONES IN REGULATION OF PHAGOCYtic ACTIVITY OF LEUKOCYTES

Gein O. N., Gein V. L.

*Perm State Pharmaceutical Academy, Perm, Russia*

Among the substances of organic synthesis occupy a special place derivatives of 3-pyrroline-2-ones that exhibit different biological activities, and are prospective study on the immunological activity. It was found that the tested compounds RAN-42, GKN-593, MM-4, MM-12 showed different effect on the phagocytic activity of peripheral blood leukocytes of rats: a substance MM-4 and RAN-42 is mainly stimulated sinking activity of leukocytes, substance MM –12 and GKN-593 provided mostly depressing effect.

*Key words:* phagocytosis, 3-pyrroline-2-ones, immunobiological activity.

**Раздел 2**  
**ЦИТОКИНЫ**  
**И ЦИТОКИНОТЕРАПИЯ**

## ИДЕНТИФИКАЦИЯ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ СОЕДИНЕНИЙ, ИНГИБИРУЮЩИХ АКТИВАЦИЮ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ИНТЕРЛЕЙКИНА IL-36 $\gamma$

Белоцерковская Е. В., Сура-Труэба С., Давидович П. Б., Мартин Ш.

*Санкт-Петербургский государственный технологический институт  
(Технический университет), Санкт-Петербург, Россия*

Интерлейкины группы IL-36 (IL-36 $\alpha$ , IL-36 $\beta$ , IL-36 $\gamma$  и IL-36Ra) являются представителями семейства IL-1. Цитокин IL-36 $\gamma$  играет важную роль в патогенезе псориаза, в результате его активации с участием эластазы нейтрофилов. В этой связи поиск низкомолекулярных ингибиторов эластазы может стать основой нового эффективного подхода в терапии псориаза. В ходе данной работы было протестировано 149 соединений, потенциально способных ингибировать эластазу. Тест с использованием синтетического субстрата эластазы Suc-AAPV-MCA позволил выявить четыре перспективных соединения: LCB016, LCB108, LCB112, LCB116. Эти соединения были изучены в отношении подавления процессинга IL-36 $\gamma$  с использованием клеток линии HeLa<sup>IL-36R</sup>. Обнаружено, что соединение LCB016 эффективно инактивирует процессинг IL-36 $\gamma$ .

*Ключевые слова:* интерлейкины, IL-36, эластаза нейтрофилов, ингибиторы эластазы, псориаз.

**Актуальность и цель работы.** Среди представителей семейства интерлейкинов IL-1 особое место занимают недавно идентифицированные цитокины группы IL-36, включающие три агониста: IL-36 $\alpha$  (IL-1F6), IL-36 $\beta$  (IL-1F7), IL-36 $\gamma$  (IL-1F8) и рецепторный антагонист – IL-36Ra (IL-1F5) [1]. Основную роль этих белков связывают с запуском и амплификацией воспалительных сигналов через активацию путей сигнальной трансдукции митоген-активируемых киназ (МАРК) и транскрипционных факторов NF- $\kappa$ B [2]. Запуск этих каскадов, в свою очередь, приводит к секреции провоспалительных факторов, в том числе цитокинов IL-8 и IL-6 [2].

Интерес к цитокинам группы IL-36, в основном, связан с участием этих интерлейкинов в патогенезе псориаза, при этом наибольшее значение отводится роли антагониста рецептора IL-36Ra [3] и агониста IL-36 $\gamma$  [4]. Так, известно, что у пациентов, страдающих бляшковым псориазом, наблюдается значительное повышение уровня интерлейкина IL-36 $\gamma$  в кератиноцитах [4]. Важно отметить, что подобно большинству членов семейства IL-1, белки IL-36 синтезируются в виде полноразмерных

предшественников, обладающих очень низкой биологической активностью. Однако удаление небольшого числа N-концевых аминокислот в цитокинах IL-36 приводит к многократному повышению биологической активности этих белков [5]. В лаборатории молекулярно-клеточной биологии (Дублин) под руководством Мартина Ш. было показано, что эластаза нейтрофилов способна эффективно активировать интерлейкин IL-36 $\gamma$ . В этой связи подавление активации интерлейкина IL-36 $\gamma$  можно рассматривать, как основу нового подхода в терапии псориаза. Однако известные на сегодняшний день ингибиторы эластазы нейтрофилов малоэффективны, либо обладают сильными побочными эффектами.

**Цель работы** заключалась в идентификации низкомолекулярных ингибиторов эластазы нейтрофилов, подавляющих процессинг интерлейкина IL-36 $\gamma$ .

**Материалы и методы.** С помощью методов молекулярного моделирования в лаборатории клеточной биотехнологии Санкт-Петербургского государственного технологического института было выявлено 149 потенциальных ингибиторов эластазы (обозначенных LCBXXX,



от Laboratory of Cell Biotechnology). Для первичной оценки ингибирующей активности изучаемых соединений использовали синтетический субстрат эластазы – Suc-AAPV–MCA (Bachem, Швейцария). Далее перспективные соединения-ингибиторы изучали в условиях процессинга полноразмерного рекомбинантного белка IL-36 $\gamma$ . Продукты реакции визуализировали методом электрофоретического разделения белков в полиакриламидном геле. Оценка биологической активности процессированных форм белка IL-36 $\gamma$  проводилась с использованием стабильно трансфицированной линии клеток HeLa<sup>IL-36R</sup>, экспрессирующей на своей поверхности рецептор IL-36R. Обработка этих клеток интерлейкинами IL-36 приводила к синтезу ряда цитокинов, в том числе белков IL-8 и IL-6, которые секретировались в среду и могли быть детектированы с помощью иммуноферментного анализа. Для проведения иммуноферментного анализа использовали коммерческие наборы реагентов (R&D, США) согласно рекомендациям производителя. Все эксперименты были проведены в трехкратной повторности.

**Результаты.** На первом этапе скрининга 149 потенциальных ингибиторов, отобранных на основе *in silico* анализа, были протестированы с использованием специфического субстрата эластазы. При этом в присутствии четырех соединений: LCB016, LCB108, LCB112, LCB116 регистрировалось значительное снижение эффективности гидролиза субстрата, свидетельствующее об ингибировании эластазы. Так, в присутствии этих соединений наблюдалось снижение ферментативной активности эластазы от 60 до 70%. Дальнейшее тестирование четырех соединений-кандидатов при более низких концентрациях показало, что требуемыми ингибирующими свойствами обладают

только соединения LCB016 и LCB116. Эти лидерные соединения были изучены на их способность подавлять процессинг рекомбинантного белка IL-36 $\gamma$  с последующей обработкой продуктами процессинга клеток HeLa<sup>IL-36R</sup>. Согласно результатам иммуноферментного анализа, соединение LCB116 подавляет активность эластазы недостаточно эффективно, в то время как LCB016 проявляет высокую ингибирующую способность и практически полностью инактивирует процессинг рекомбинантного белка IL-36 $\gamma$ .

Таким образом, согласно результатам экспериментов с использованием синтетического субстрата эластазы и рекомбинантного белка IL-36 $\gamma$ , соединение LCB016 является перспективным ингибитором эластазы нейтрофилов. В дальнейшем планируется более детальное изучение ингибирующих свойств LCB016, а также оценка токсичности данного соединения в экспериментах на культурах клеток и модельных животных.

Работа выполнена при поддержке Правительства Российской Федерации для государственной поддержки научных исследований № 14.B25.310013.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dunn E., Sims J.E., Martin J.H.N., O'Neill L.A.J. Trends Immunol, 22, 533-536.
2. Towne J.E., Garka K.E., Renshaw B.R., Virca G.D., Sims J.E. J Biol Chem 2004, 279, 13677-13688.
3. Marrakchi S., Guigue P., Renshaw B.R. et al. N Engl J Med 2011, 365, 620-628.
4. Derme A.M., Wilsmann-Theis D., Wagenpfeil J., Holzel M., Ferring-Schmitt S. et al. J Invest Dermatol 2015, 135, 1025-1032.
5. Towne J.E., Renshaw B.R., Douangpanya J., Lipsky B.P., Shen M., Gabel C.A., Sims J.E. J Biol Chem 2011, 286, 42594-42602.

### IDENTIFICATION OF SMALL MOLECULES FOR IL-36 $\gamma$ PROCESSING INHIBITION

Belotserkovskaya E. V., Sura-Trueba S., Davidovich P. B., Martin S. J.

*Saint-Petersburg State Technological Institute (Technical University), Saint-Petersburg, Russia*

IL-36 $\alpha$ , IL-36 $\beta$  and IL-36 $\gamma$  are members of the IL-1 family which require N terminus processing to be fully active. Recently it has been shown that neutrophil elastase enzymatically truncates IL-36 $\gamma$ , producing the activated protein, which is involved in psoriasis. This work focuses on screening of small molecules capable of elastase inhibiting. According to *in silico* analysis, we selected 149 potential inhibitors. Using Suc-AAPV–MCA substrate, we detected 4 candidate compounds, namely LCB016, LCB108, LCB112, LCB116. These compounds were tested for IL-36 $\gamma$  processing inactivation and cellular response using HeLaIL-36R cell line. We showed that LCB016 inhibits elastase most effectively, according to substrate hydrolysis assay and cell response.

## ОЦЕНКА УРОВНЯ ЦИТОКИНОВ У БОЛЬНЫХ С ГЕМОМРАГИЧЕСКОЙ ЛИХОРАДКОЙ С ПОЧЕЧНЫМ СИНДРОМОМ

Валиуллина А. Х.<sup>1</sup>, Мартынова Е. В.<sup>1</sup>, Гаранина Е. Е.<sup>1</sup>,  
Хайбуллина С. Ф.<sup>1,2</sup>, Ризванов А. А.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», Казань, Россия;

<sup>2</sup>Институт Веттермора-Питерсена нейро-иммунных заболеваний, Рено, США

Рассмотрено состояние уровня цитокинов у больных геморрагической лихорадкой с почечным синдромом. Диагностическая значимость оценки уровня цитокинов заключается в констатации самого факта его повышения или понижения у больных для определения тяжести и прогнозирования результатов. В ходе исследований было обнаружено изменение в уровне следующих цитокинов: IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, CXCL-8, IL-10, IL-12 и CCL2. Полученные результаты позволяют предположить, что при ГЛПС происходят существенные изменения в сыворотке крови рядов цитокинов и хемокинов, которые учувствуют в регуляции воспаления и активации иммунных реакций.

**Ключевые слова:** геморрагическая лихорадка с почечным синдромом, хантавирус, цитокины, хемокины

**Актуальность и цель работы.** Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (ГЛПС) – острая вирусная природно-очаговая зоонозная инфекция характеризующаяся синдромом интоксикации, развитием универсального капилляро-токсикоза с геморрагическими проявлениями и поражением почек. ГЛПС по заболеваемости занимает первое место среди природно-очаговых инфекций в РФ. На Европейской территории России наиболее активными очагами заболеваемости являются регионы между Волгой и Уралом (Башкирия, Татарстан, Удмуртия, Самарская и Ульяновская области). Татарстан является активно действующим очагом, заболеваемость в некоторые годы достигает 64,4 на 100 тыс. населения (2003–2004 гг.) [1]

В 2013 году уровень заболеваемости ГЛПС снизился на 72%, по сравнению с 2012 годом. Зарегистрировано 5826 случаев заболевания ГЛПС, что в 75 раз выше по сравнению с общероссийскими показателями.

Возбудителями являются РНК-геномные вирусы рода *Hantavirus* семейства *Bunyaviridae*. В настоящее время известны около 30 сероваров возбудителя ГЛПС. Из них на территории России циркулируют 2 генотипа: *Dobrava-Belgrad*; *Puumala* [1] В странах Северной и Южной Америки хантавирусы вызывают похожее заболевание – хантавирусный легочный синдром.

Вирусы, выделенные в разных местах от различных грызунов, вызывают заболевания с неодинаковой степенью тяжести.

Хантавирусный вирион имеет наружную оболочку и три сегмента вирусной РНК отрицательной полярности. Известно, что многим вирусам для наилучшего проникновения необходимы липидные включения на мембране клетки. В частности и вирусу ГЛПС. Патологический процесс при ГЛПС развивается стадийно. В первой стадии заражения происходит внедрение вируса через слизистые оболочки дыхательных путей и размножение вируса в лимфатических узлах. На следующем этапе вирус оказывает инфекционно-токсическое действие на рецепторы сосудов и нервную систему. На третьем этапе происходит образование иммунных комплексов, и вирус элиминируется из организма. Далее происходят висцеральные поражения органов. И на заключительном этапе заболевания происходит восстановление нарушенных функций и формирование стойкого иммунитета [2].

Цитокины представляют собой группу полипептидных медиаторов, участвующих в формировании и регуляции защитных реакций организма, они вовлечены фактически в каждое звено иммунитета. Острая фаза хантавирусной инфекции сопровождается гиперпродукцией рядом тканей деструктивных цитокинов и хе-

мокинов, в том числе  $\alpha$ -фактора некроза опухолей, концентрация которого коррелирует с тяжестью клинических проявлений. Некоторые воспалительные цитокины могут определяться в моче. Воспалительные цитокины, хемокины, а также маркеры остро-фазового ответа, очевидно, играют центральную роль в развитии эндотелиальной дисфункции, следствием которой является формирование органного повреждения, реализуемого при резком увеличении объема внутриклеточной жидкости за счет проникновения в нее жидкой части плазмы, а также нарастающих расстройств системного и тканевого гемостаза. Таким образом, формирование и прогрессирование органных поражений определяется в первую очередь нарастающей дисфункцией эндотелиоцитов с резким увеличением проницаемости эндотелия и расстройством систем гемостаза, нередко достигающим степени ДВС-синдрома. Пропотевание жидкой части плазмы в ткани-мишени и расстройство органной гемодинамики с образованием тромбов в микроциркуляторном русле и одновременным формированием очагов кровоизлияний определяют формирование недостаточности функций соответствующих органов – почек и легких.

**Целью нашего исследования** было изучить состояние уровня цитокинов у больных ГЛПС.

**Материалы и методы.** Все больные ГЛПС были госпитализированы в ГУАЗ РКИБ им. Агафонова, города Казани в наблюдательное отделение. В стерильных условиях квалифицированным медицинским персоналом производили забор сыворотки крови больных. Серологическая диагностика проводилась в больнице иммуноферментным методом на выявление антител к вирусу ГЛПС. Проводили ПЦР-анализ на наличие белка нуклеокапсида хантавирусов

в крови больных. Используя систему мультиплексного анализа на платформе Luminex 2000 («Bio-Rad») и набора 27-plex Human Cytokine («Bio-Rad») проводили количественную оценку цитокинов в сыворотке крови и мочи больных ГЛПС и здорового контроля.

**Результаты и обсуждение.** Количество больных составило 29 человек, из них 24 мужчин и 5 женщин. Здоровый контроль составил 12 человек без признаков ГЛПС и поражений почек. Серологическая диагностика выявила наличие 2 основных видов антител к ГЛПС IgG и IgM. ПЦР анализ выявил наличие белка нуклеокапсида хантавируса в сыворотке больных. Диагностическая значимость оценки уровня цитокинов заключалась в констатации самого факта его повышения или понижения у больных для определения тяжести и прогнозирования результатов.

При сравнении с контролем, было обнаружено изменение в уровне следующих цитокинов: IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, CXCL-8, IL-10, IL-12 и CCL2. Уровень IL-2 и IL-12 снизился, в то время как уровень IL-10 и CCL увеличились по сравнению к здоровому контролю. Уровень IL-1 $\beta$  снизился, в то время как уровень хемокинов CXCL-8, увеличился по сравнению со здоровым контролем. Эти данные позволяют предположить, что при ГЛПС происходят существенные изменения в сыворотке крови рядов цитокинов и хемокинов, которые участвуют в регуляции воспаления и активации иммунных реакций.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Фазылов В. Х., Кравченко И. Э., Бабушкина Ф. А. Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом. КГМУ, Казань 2008.
2. Зверева В. В., Бойченко М. Н. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология. ГЭОТАР-Медиа, Москва 2013. Т. 2.

### ASSESSMENT OF THE LEVEL OF CYTOKINES IN PATIENTS WITH HEMORRHAGIC FEVER WITH RENAL SYNDROME

Valiullina A. K.<sup>1</sup>, Martynova E. V.<sup>1</sup>, Garanina E. E.<sup>1</sup>,  
Khaiboullina S. F.<sup>1,2</sup>, Rizvanov A. A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Kazan Federal University, Kazan, Russia; <sup>2</sup>Whittemore Peterson Institute for Neuro-Immune Disease, Reno, Nevada, USA

The cytokine level in patients suffering from hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) was studied. Assessment of cytokine level is very important in prediction of disease severity and duration. Our studies show changes in the levels of the following cytokines and chemokines: IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, CXCL-8, IL-10, IL-12 and CCL2. As such, it can be concluded that a significant change in a number of cytokines and chemokines that participate in the regulation of inflammation and activation of immune responses occurs in HFRS patients.

## ВЛИЯНИЕ ФИЗИЧЕСКОЙ НАГРУЗКИ РАЗЛИЧНОЙ ИНТЕНСИВНОСТИ НА УРОВЕНЬ ИНТЕРЛЕЙКИНОВ 6, 4

Ермолаева Е. Н.<sup>1</sup>, Кривохижина Л. В.<sup>1</sup>, Мезенцева Е. А.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ГОУ ВПО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России; <sup>2</sup>НИИ иммунологии ЮУГМУ, Челябинск, Россия

Острая физическая нагрузка и хроническая нагрузка субмаксимальной мощности вызывает повышение в крови провоспалительного цитокина ИЛ-6, возрастание которого приводит к удовлетворению высоких энергетических требований. Постепенное повышение ИЛ-6 на правах тенденции при ХФН умеренной мощности, можно рассматривать как механизм адаптации к нагрузке. Повышение цитокина ИЛ-4 регистрируется лишь при хронической физической нагрузке субмаксимальной мощности на 21 сутки, что можно расценивать как фактор, способствующий устранению повреждений, вызванных интенсивной физической деятельностью.

*Ключевые слова:* интерлейкин 4, интерлейкин 6, физическая нагрузка.

Следствием чрезмерных физических нагрузок может быть повреждение, из-за нарушений макро- и микрогемодинамики, формирования гипоксии, наличия синдрома ишемия-реперфузия, миграции лейкоцитов в работающие мышцы, нарастания катаболических процессов и другие. В ответ на лейкоцитарную реакцию и мышечную активность должна быть усилена продукция цитокинов, которые обладают мультифакторным действием: обеспечивают процессы межсистемного взаимодействия, отражают иммунный статус организма спортсмена и адаптацию к физическим нагрузкам. Требуется дополнения вопрос – зависит ли продукция цитокинов от интенсивности, длительности физической нагрузки и каково соотношение между про- и противовоспалительными цитокинами.

**Цель исследования** – в условиях эксперимента изучить изменение уровня ИЛ-6 и ИЛ-4 в крови при физических нагрузках различной интенсивности.

**Материалы и методы.** Исследование проведено на 54 белых беспородных крысах обоего пола массой 250-300 грамм. Все эксперименты выполнены согласно Европейской Конвенции по защите экспериментальных животных (Хельсинской декларации 1975 г. и ее пересмотра в 1983 г.). Исследуемые животные были разделены на контрольную группу (интактные крысы), опытные – животные, подвергавшиеся

физической нагрузке разной интенсивности. Одна группа животных подверглась острой физической нагрузке субмаксимальной мощности (ОФН), вторая – хронической физической нагрузке (ХФН) субмаксимальной мощности, третья – ХФН умеренной мощности. Модель острой физической нагрузки воспроизводилась по методу А. Ф. Краснова, Г. И. Самодановой и др. Животные плавали в течение 4-х минут с грузом массой 20% от веса тела. Температура воды – 32°C. Забор крови производился через 25 минут после плавания. ХФН субмаксимальной мощности моделировали ежедневным плаванием в течение 30 минут. Нагрузку увеличивали постепенно: первые семь дней животные ежедневно плавали без груза, следующие две недели животные плавали с грузом 2% от массы тела. На 9, 15 и 21 день эксперимента, животные подвергались дополнительно максимальной физической нагрузке: плавали в течение 4-х минут с грузом массой 20% от веса тела. ХФН умеренной мощности моделировали ежедневным плаванием в течение 30 минут. Забор крови производился на 9, 15 и 21 день эксперимента после физической нагрузки.

Интерлейкины 6 и 4 определяли иммуноферментным методом с помощью наборов реагентов Rat IL-6, Rat IL-4 фирмы «Platinum ELISA» (Австрия). Для определения достоверности различий средних величин применяли критерии непараметрической статистики Манна-

Уитни (U); определяли основную тенденцию изменений (тренд) и коэффициент аппроксимации для оценки силы влияния использовали однофакторный дисперсионный анализ.

**Результаты исследования и их обсуждение.** Уровень ИЛ-6 изменяется в зависимости от интенсивности физической нагрузки. При ОФН ИЛ-6 возрастает через 25 минут после мышечной активности относительно контроля на 70% ( $p < 0,01$  U). При ХФН субмаксимальной мощности регистрируется постепенное повышение уровня цитокина с начала эксперимента, что подтверждает тренд с коэффициентом аппроксимации  $R^2 = 0,93$ . Достоверное повышение ИЛ-6 отмечается на 42% – 15 суток ( $p < 0,028$  U) и на 84% – 21 сутки ( $p < 0,012$  U). При ХФН умеренной мощности постепенное повышение уровня ИЛ-6 наблюдается относительно контроля лишь на правах тенденции, но закономерность повышения подтверждается трендом и коэффициентом аппроксимации  $R^2 = 0,7859$ . В результате количественное значение ИЛ-6 не имеет достоверных различий с ХФН субмаксимальной мощности и занимает промежуточное положение между контролем и субмаксимальной нагрузкой. Однофакторный дисперсионный анализ доказал влияние ОФН и ХФН субмаксимальной мощности на уровень ИЛ-6: вклад ОФН составил в среднем 55,8% ( $p < 0,0058$ ), вклад ХФН субмаксимальной мощности 32,7% ( $p < 0,027$ ).

Возрастание ИЛ-4 на 17,4 ( $p < 0,025$  U) отмечается на 21 день эксперимента при ХФН субмаксимальной мощности. Иные виды физической нагрузки не привели к увеличению ИЛ-4.

Указывается, что при физической активности источником ИЛ-6 являются клетки скелетной мускулатуры секретирующие до 10–35% от его уровня в циркуляции [1]. Подтверждается, что секреция ИЛ-6 определяется интенсивностью нагрузки: у велосипедистов при умеренной нагрузке (40% максимального потребления кислорода) уровень ИЛ-6 практически не менялся, а при большей нагрузке (60% максимального потребления кислорода) спустя 3 часа езды на велосипеде он повышался в 2,5 раза. Обнаружено, что во время двигательной активности ИЛ-6 помимо воспалительной реакции участвует в других физиологических процессах. В печеночных и жировых клетках ИЛ-6 приводит к повышенному выделению носителей энергии: глюкозы и жирных кислот, а в клетках скелетной

мускулатуры – к их усвоению и утилизации. ИЛ-6 в мышечных клетках не только усиливает усвоение энергетического носителя, но и стимулирует оксидацию жирных кислот. По-видимому, метаболическое действие цитокина реализуется путем его воздействия на регуляторные внутриклеточные комплексы, а также за счет разнонаправленного изменения чувствительности к инсулину [2]. ИЛ-6 способствует также долгосрочной адаптации к физическим нагрузкам, которая заключается в новообразовании митохондрий и изменении состава мышечных волокон. Было высказано предположение, что именно ИЛ-6 является гипотетическим «фактором тренировки» [3].

Интерлейкин-4, представляет собой плеiotропный цитокин, который играет важную роль в борьбе с воспалением. Основными производителями ИЛ-4 являются Т-клетки, тучные клетки и нейтрофилы. Было показано, что и другие клетки, такие как, мышечные клетки, гепатоциты, фибробласты способны продуцировать ИЛ-4. В ряде исследований было показано, что ИЛ-4, ИЛ-13, ИЛ-4RA и ИЛ-13Ra1 присутствуют в скелетных мышцах и увеличивают свою концентрацию после силовых тренировок [4]. Повреждения мышечных волокон становятся триггерами и запускают высвобождение противовоспалительных цитокинов. ИЛ-4 приводит к устранению повреждений мышц, вызванных физической нагрузкой. Последние исследования показывают, что ИЛ-4 способствует росту мышечных клеток, и что этот цитокин действует как промиграционный агент для миогенных клеток. При отсутствии ИЛ-4 или рецепторов к ИЛ-4 происходит снижение мышечной массы и количества ядер в мышечных клетках [5]. Таким образом, увеличение содержания ИЛ-4 после утомительной тренировки может быть важным для роста и восстановления мышечных волокон.

**Заключение.** Итак, острая физическая нагрузка и хроническая нагрузка субмаксимальной мощности вызывает повышение в крови провоспалительного цитокина ИЛ-6, возрастание которого приводит к удовлетворению высоких энергетических требований. Постепенное повышение ИЛ-6 на правах тенденции при ХФН умеренной мощности, можно рассматривать как механизм адаптации к нагрузке. Повышение цитокина ИЛ-4 регистрируется лишь при хронической физической нагрузке субмаксимальной мощности на 21 сутки, что

можно расценивать как фактор, способствующий устранению повреждений, вызванных интенсивной физической деятельностью.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Pedersen B.K. // Biochem. Soc. Trans.– 2007.– V. 35.– P. 1295-1297.
2. Febbraio M. A., Hiscock N., Sacchetti M. et al. // Diabetes.– 2004.– V. 53.– P. 1643-1648.
3. Weigert C., Schleicher E.D. // Diabetes und Stoffwechsel.– 2005.– V. 14.– P. 141-149.
4. Prokopchuk O., Liu Y., Wang L. et al.// Exerc Immunol Rev.– 2007.– V. 13.– P. 67-75.
5. Hoyer K.K., Doms H., Barron L., Abbas A.K. // Immunol Rev.– 2008.– V. 226.– P. 19-28.

### INFLUENCE OF PHYSICAL ACTIVITY OF VARYING INTENSITY ON INTERLEUKIN 6, 4

<sup>1</sup>Ermolaeva E. N., <sup>1</sup>Krivohizhina L. V., <sup>2</sup>Mezentceva E. A.

<sup>1</sup>South Ural State Medical University, <sup>2</sup>Research Institute of Immunology South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russia

Acute and chronic exercise load submaximal power causes an increase in the blood of the proinflammatory cytokine IL-6, which gives rise to the satisfaction of the high energy requirements. Gradual increase of IL-6 on a trend at chronic moderate power exercise can be viewed as a mechanism of adaptation to the load. Increasing the cytokine IL-4 is recorded only in chronic physical load submaximal power for 21 hours, which can be considered as a factor contributing to the elimination of damage caused by intense physical activity.

*Keywords:* interleukin 4, interleukin 6, exercise.

### ОЦЕНКА ИНГИБИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ АНТАГОНИСТА РЕЦЕПТОРА IL-36Ra В МОДЕЛЬНОМ ЭКСПЕРИМЕНТЕ НА КЛЕТКАХ ЛИНИИ HeLa<sup>IL-36R</sup>

**Зиновьева А. Е., Белоцерковская Е. В., Сура-Труэба С., Давидович П. Б., Мартин Ш.**

*Санкт-Петербургский государственный технологический институт (Технический университет), Санкт-Петербург, Россия*

Цитокины IL-36 взаимодействуют со специфичным рецептором IL-36R, активируя сигнальный каскад, инициация которого приводит к экспрессии провоспалительных цитокинов и развитию воспаления. Антагонист рецептора IL-36Ra является естественным ингибитором воспалительного процесса, блокируя рецептор IL-36R, благодаря чему является перспективным средством для применения в терапии некоторых форм псориаза. В настоящей работе произведена оценка подавляющей активности рекомбинантного белка IL-36Ra<sup>DEV</sup> с использованием клеточной линии HeLa<sup>IL-36R</sup>. Выявлено, что для ингибирования клеточного ответа на стимуляцию процессированным белком IL-36<sup>DEV</sup> необходим молярный избыток антагониста рецептора IL-36Ra<sup>DEV</sup>.

*Ключевые слова:* интерлейкины, IL-36, рецептор-антагонист IL-36Ra.

**Актуальность и цель работы.** Интерлейкины группы IL-36 являются представителями семейства белков IL-1. Как и другие члены семейства IL-1, белки IL-36 синтезируются в неактивном

виде и для приобретения полной активности им необходим ферментативный процессинг [1]. Активированные агонисты при взаимодействии с рецептором IL-36R и корецептором IL-

IRAcP (от англ. Interleukin-1 Receptor Accessory protein) инициируют сигнальный каскад, ведущий к активации факторов транскрипции NF- $\kappa$ B и митоген-активируемых протеинкиназ (МАРК), что, в свою очередь приводит к синтезу провоспалительных медиаторов и развитию воспаления [2].

Помимо агонистов, важную роль в развитии воспалительных реакций играет антагонист рецептора IL-36Ra, который при связывании с рецептором IL-36R блокирует рекрутинг ко-рецептора, тем самым, инактивируя действие провоспалительных агонистов IL-36 [3]. Известно, что мутации в гене антагониста рецептора *IL-36RN* ассоциированы с развитием генерализованного пустулезного псориаза (ГПП), одной из наиболее тяжелых и опасных для жизни форм псориаза [4]. Очевидно, что использование антагониста рецептора IL-36Ra при лечении псориаза, обусловленного мутациями в гене *IL-36RN*, может стать перспективным направлением терапии этого заболевания, тяжело поддающегося лечению. В пользу этого предположения указывают описанные случаи успешной терапии ГПП с использованием препарата анакинра, содержащего антагонист рецептора интерлейкина 1 (IL-1Ra) [5]. Несмотря на большой потенциал использования IL-36Ra в терапии псориаза, следует отметить недостаточную изученность ингибирующих свойств этого антагониста в отношении рецептора IL-36R.

**Целью данной работы** являлась оценка активности антагониста рецептора IL-36Ra<sup>DEVD</sup> в отношении подавления активации рецептора IL-36R в условиях модельного эксперимента на клеточной линии HeLa<sup>IL-36R</sup>.

**Материалы и методы.** Для проведения исследования были использованы рекомбинантные белки IL-36 $\beta$ <sup>DEVD</sup>, IL-36Ra<sup>DEVD</sup>, каспаза-3, полученные с помощью бактериального штамма *Escherichia coli* BL21 (DE3), трансформированного плазмидными векторами pET45b(+) и pET23(+), несущими кодирующие последовательности соответствующих белков. Очистку рекомбинантных белков проводили методом аффинной хроматографии с использованием агарозных гранул Ni-NTA, специфичных к гистидиновым ярлыкам (6x-His-tag) целевых белков (Sigma, США).

Рекомбинантные цитокины IL-36 $\beta$ <sup>DEVD</sup> и IL-36Ra<sup>DEVD</sup> содержали DEVD-мотив из аминокислот Асп-Глу-Вал-Асп, специфично узнаваемый каспазой-3. Для активации полнораз-

мерных рекомбинантных белков IL-36 $\beta$ <sup>DEVD</sup> и IL-36Ra<sup>DEVD</sup> осуществляли их процессинг при 37°C в течение 2 ч в присутствии каспазы-3.

Для оценки активности полноразмерных и процессированных форм белков использовали стабильно трансфицированную линию клеток HeLa<sup>IL-36R</sup>, экспрессирующую рецептор IL-36R на высоком уровне. Клетки линии HeLa<sup>IL-36R</sup> инкубировали в среде RPMI (Биолот, Россия), содержащей 5% эмбриональной бычьей сыворотки, при температуре 37°C в плотности  $5 \times 10^4$  клеток на лунку в течение 1 сут. Затем проводили обработку клеток белком IL-36 $\beta$  при различных концентрациях IL-36Ra. Через 24 ч после обработки клеток отбирали супернатант, содержащий белки IL-6, IL-8, CXCL-1, уровень которых измеряли с помощью иммуноферментного анализа согласно протоколу производителя (R&D, США).

Плазмидные векторы, бактериальный штамм *E. coli* BL21 (DE3) и трансфицированная линия эпителиальных клеток человека HeLa<sup>IL-36R</sup> были любезно предоставлены лабораторией молекулярно-клеточной биотехнологии (Тринити-колледж, Дублин).

**Результаты исследования.** На первом этапе исследования была изучена активность полноразмерных и процессированных белков IL-36 $\beta$ <sup>DEVD</sup> в отношении рецептора IL-36R в клетках линии HeLa<sup>IL-36R</sup>. В результате титрования полноразмерных и процессированных белков IL-36 $\beta$ <sup>DEVD</sup> было показано, что процессированные формы белка IL-36 $\beta$ <sup>DEVD</sup> обладают высокой активностью, и при низких концентрациях (от 2 пикомоль и более) вызывают секрецию цитокинов IL-8 и IL-6 клетками HeLa<sup>IL-36R</sup>, в то время как полноразмерная форма IL-36 $\beta$ <sup>DEVD</sup> не оказывает подобного воздействия.

Второй этап данной работы заключался в оценке способности рецептора антагониста IL-36Ra<sup>DEVD</sup> подавлять связывание рецептора с активированными формами IL-36 $\beta$ <sup>DEVD</sup> в условиях оптимальной концентрации агониста, установленной нами на первом этапе исследования. Выявлено, что процессированная форма белка IL-36Ra<sup>DEVD</sup> подавляет активацию клеток HeLa<sup>IL-36R</sup>. Так, в условиях порядка 1000-кратного избытка IL-36Ra по отношению к IL-36 $\beta$ , уровень секретируемых белков IL-6, IL-8 и CXCL-1 снижался на 50% по сравнению с положительным контролем, в качестве которого был добавлен только IL-36 $\beta$ <sup>DEVD</sup>. В то же время снижение уровня белков IL-6,

IL-8 и CXCL-1 на 80–90% детектировалось нами при избытке IL-36Ra<sup>DEVD</sup> в 10<sup>4</sup> раз. Таким образом, для подавления активации рецептора IL-36R в клетках HeLa<sup>IL-36R</sup> необходим 1000–10000-кратный избыток IL-36Ra<sup>DEVD</sup> по отношению к IL-36β<sup>DEVD</sup>.

Работа выполнена в НИЛ «Клеточная биотехнология» при поддержке гранта Правительства Российской Федерации для государственной поддержки научных исследований № 14.B25.310013.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Towne J.E., Garka K.E., Renshaw B.R. et al. J Biol Chem 2004, 279, 13677–13688.
2. Towne J.E., Renshaw B.R., Douangpanya J.J. et al. Biol Chem 2011, 286 (49), 42594–42602.
3. Debets R., Timans J.C., Homey B. et al. J Immunol 2001, 167, 1440–1446.
4. Marrakchi S., Guigue P., Renshaw B.R. et al. N Engl J Med 2011, 365, 620–628.
5. Rossi-Semerano L., Piram M., Chiaverini C. et al. Pediatrics 2013, 132, 1043–1047.

## RECEPTOR ANTAGONIST IL-36RA INHIBITION ACTIVITY IN HELA<sup>IL-36R</sup> CELLS

Zinovieva A.E., Belotcerkovskaya E.V., Sura-Trueba S., Davidovich P.B., Martin S.J.

*Saint-Petersburg State Technological Institute (Technical University), Saint-Petersburg*

IL-36 cytokines signal through IL-36R receptor. This complex triggers the cascade, which induces the expression of proinflammatory cytokines. Receptor antagonist IL-36Ra binds to IL-36R and acts as a natural inhibitor of IL-36-mediated inflammatory response. IL-36Ra is a perspective candidate for drug therapy of psoriasis. Modified IL-36Ra<sup>DEVD</sup> and IL-36β<sup>DEVD</sup> processing and interaction was studied using HeLa<sup>IL-36R</sup> cell line. It was found that a high molar excess of IL-36Ra is necessary to inhibit cellular response to fully active IL-36β.

## ИММУНОЛОГИЧЕСКАЯ КОНЦЕПЦИЯ ПРОГРЕССИРОВАНИЯ ЦЕРВИКАЛЬНЫХ ИНТРАЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ НЕОПЛАЗИЙ

Кононова И. Н.

*ГБОУ ВПО Уральский государственный медицинский университет Минздрава России, Екатеринбург, Россия*

Выявленные нарушения мукозального иммунитета, детерминированные генетическими полиморфизмами экспрессии цитокинов, при снижении адаптивного потенциала и инвазии ВПЧ, модулируют риск возникновения и прогрессирования диспластических процессов в шейке матки. В этой связи необходимо проведение иммунокоррекции предпочтительно пептидными регуляторами иммунитета с различными способами введения препарата.

**Ключевые слова:** цервикальные интраэпителиальные неоплазии, иммунный статус, полиморфизм генов выработки цитокинов.

По данным многочисленных исследований онкобелок E7, выделяющийся вирусом папилломы человека, вызывает иммуносупрессию на местном уровне при переходе вируса в стадию интегративной инфекции [1]. При этом выраженность и характер реакций си-

стемы иммунологического ответа могут быть различными и зависят как от адаптивного иммунитета, так и внешних стресс-факторов [2]. Высокая онкогенная роль ВПЧ с формированием РШМ [3], рецидивирование процесса после деструктивных методов [4], вызываемые



вирусом иммунные дисфункции [5] определяют необходимость изучения взаимосвязей между носительством полиморфизмов генов про- и противовоспалительных цитокинов и состоянием мукозального иммунитета для определения роли выявленных взаимосвязей в возникновении и прогрессировании цервикальных интраэпителиальных неоплазий и последующей разработкой персонализированной иммунной коррекции.

**Цель исследования:** изучение взаимосвязей между иммунными дисфункциями, полиморфизмом генов выработки цитокинов у пациенток с CIN с последующим обоснованием иммуномодулирующей терапии

**Материалы и методы.** Проведено обследование 50 пациенток репродуктивного возраста с верифицированным гистологически диагнозом «ВПЧ-позитивная цервикальная интраэпителиальная неоплазия I, II, III степени». Для изучения местного иммунитета производилось взятие содержимого цервикального канала в количестве 5 мкл с дальнейшим разведением в 5 мл физиологического раствора и последующим выделением надосадочной жидкости. Были определены уровни sIgA, IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-10, FNO- $\alpha$ , VEGF, IFN- $\alpha$  АИТ АТ с помощью тест-систем «Вектор Бест» (Новосибирск) проведено изучение индивидуального генетического профиля по образцам ДНК путем выявления полиморфных аллелей генов. Всем пациенткам провели типирование следующих генетических полиморфизмов, ассоциированных с системой цитокинов – IL-1b3953 C>T, IL1R1 T>C, IL1-RN T>C, IL-4\_33 C>T, IL-6\_174 G>C, IL-10\_592 A>C, IFNG T>A, TNF\_238 G>A, VEGFA\_634 G>C. Анализ проводился по трем генотипам у каждого генетического полиморфизма: генотип nn – гомозигота по «дикому» (низкопродуцирующему) аллелю, генотип nv – гетерозигота, генотип vv – гомозигота по полиморфному (высокопродуцирующему) аллелю. Группу контроля составили 30 относительно здоровых пациенток без патологии шейки матки.

**Результаты и обсуждение.** При изучении частоты выявления полиморфизмов в гене IL-1 выявлено: при CIN I наиболее часто встречаются полиморфизмы: «дикого» аллеля генотипа TT гена IL-4\_33, а также «дикого» аллеля генотипа AA IL-10\_592.

При этом полиморфизм «дикого» аллеля генотипа TT гена IL-4\_33 имел отрицательную

сильную коррелятивную связь с выработкой IL-4 ( $r=-0,732$ ) и положительную среднюю коррелятивную связь с воспалительным типом иммунного ответа ( $r=+0,467$ ) и может свидетельствовать о влиянии нарушения клеточного звена иммунитета в сторону воспалительного компонента на прогрессирование CIN.

Для CIN II наиболее характерно выявление гомозиготного полиморфного аллеля CC гена IL-1b3953 и «дикого» аллеля GG гена TNF\_238. При этом выявлена отрицательная высокая коррелятивная связь полиморфизма «дикого» гомозиготного генотипа CC гена IL-1b3953 с выработкой IL-1 $\beta$  ( $r= -0,724$ ) и противовоспалительным типом иммунного реагирования ( $r=+0,832$ ), что свидетельствует о снижении воспалительного потенциала у пациенток с данным типом иммунного реагирования и увеличении повреждающего действия на цервикальный эпителий противовоспалительного компонента. Выявленные корреляционные связи гомозиготного «дикого» аллеля GG гена TNF\_238CC со сниженной выработкой TNF $\alpha$  ( $r= -0,698$ ) и с иммунодефицитным типом мукозального иммунитета ( $r=+0,684$ ) может свидетельствовать об истощении ресурсов макроорганизма на фоне длительного хронического воспалительного процесса в прогрессировании CIN II.

У пациенток с CIN III наиболее часто встречались полиморфизм гомозиготного аллеля CC гена IL1R1, полиморфизма генотипа GG гена IL-6\_174, «дикого» аллеля TT гена IFNG, гомозиготного генотипа CC VEGFA\_634. При этом имелась средняя отрицательная коррелятивная связь генотипа GG гена IL-6\_174 с выработкой IL-6 и средняя положительная – с противовоспалительным типом ( $r=+0,548$ ), средняя положительная коррелятивная связь полиморфизма генотипа TT гена IFN $\gamma$  со сниженной выработкой IFN $\gamma$  ( $r=-0,845$ ) и с иммунодефицитным типом иммунного реагирования ( $r=+0,823$ ). Следует отметить положительную сильную коррелятивную связь между полиморфизмом генотипа GG гена VEGFA\_634 и показателем VEGF ( $r=+0,876$ ), рост которого сопровождается неангиогенезом диспластически измененного эпителия, что свидетельствует об индукции экспрессии тканевых факторов эндотелиальными клетками и моноцитами при длительном воздействии вирусно-бактериальных ассоциаций, и может являться информативным показателем течения и ис-

хода патологической трансформации цервикального эпителия.

Исходя из вышеизложенного, пациентки с CIN I, II, III нуждаются в длительной иммунокоррекции на этапе лечения и реабилитации. Учитывая преимущества пептидного регулятора иммунитета – имунофана (пептидного иммунооксидредуктанта), заключающиеся в коррекции иммунной системы, восстановлении баланса окислительно-антиокислительной реакции организма; с действием препарата в течение 2–3 часов после введения (быстрая фаза), продолжающимся до 4-х месяцев (средняя и медленная фазы), наиболее целесообразно назначение имунофана, продемонстрировавшими наиболее эффективное комплексное лечение при физиофармакологическом воздействии кавитированных растворов [5].

Исходя из вышеизложенного, иммунные нарушения мукозального иммунитета, детерминированные генетическими полиморфизмами экспрессии цитокинов, при снижении

адаптогенного потенциала и инвазии ВПЧ, модулируют риск возникновения и прогрессирования диспластических процессов в шейке матки. В этой связи необходимо проведение иммунокоррекции предпочтительно пептидными регуляторами иммунитета с различными способами введения препарата.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гизингер О. А., Кононова И. Н., Летяева О. В. – Врач. – 12.2014. – С. 70-73.
2. Кононова И. Н., Рогачева Т. В. Медицинская психология в России: электрон. науч. журн. – 2015. – N 1 (30) [Электронный ресурс]. – URL: <http://mprj.ru>.
3. Аксель Е. М. Онкогинекология. – 2012. – № 1. – С. 18-23.
4. Кононова И. Н., Обоскалова Т. А., Ворошилина Е. С., Кузина Т. В. Ж. Акушерство и гинекология. – № 2. – 2012.
5. Обоскалова Т. А., Кононова И. Н., Ворошилина Е. С. Уральский мед. журнал. 2013. – № 4 (109) с. 46-51.

### THE IMMUNOLOGICAL CONCEPT OF PROGRESSION OF CERVICAL INTRAEPITHELIAL NEOPLASIAS

Kononova I. N.

*Ural state medical University, Yekaterinburg, Russia*

The violations mucosal immunity, deterministic genetic polymorphisms of cytokine expression, while reducing adaptogenic potential and invasion of HPV, modulate the risk of onset and progression of dysplastic processes in the cervix. In this regard, it is necessary to conduct immunomodulation preferably a peptide regulators of immunity with different ways of drug administration.

*Keywords:* cervical intraepithelial neoplasia, immune status, genetic polymorphism production of cytokines.

## ИССЛЕДОВАНИЕ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНОЙ АКТИВНОСТИ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ В ДИНАМИКЕ ЛЕЧЕНИЯ ПОСТИНФАРКТНОГО КАРДИОСКЛЕРОЗА

Краснова Л. В., Беленюк В. Д., Гвоздев И. И., Савченко А. А.

*ФГБНУ «Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера»,  
Красноярск, Россия*

Постинфарктный кардиосклероз как одна из форм ишемии имеет исключительную распространенность среди населения РФ. Для комплексного исследования данной проблемы была проанализирована хемилюминесцентная активность нейтрофильных гранулоцитов у больных с постинфарктным кардиосклерозом. Было выявлено значительное снижение эффективности развития кислородного взрыва, активно задействованного в воспалительных процессах, протекающих при данном заболевании относительно контрольных значений.

*Ключевые слова:* нейтрофилы, хемилюминесценция, кардиосклероз

Кардиосклероз является одним из наиболее распространенных причин смертности, а также временной и стойкой утраты трудоспособности населения в развитых странах мира. В связи с этим, проблема кардиосклероза занимает одно из ведущих мест среди важнейших медицинских проблем XXI века [5]. Для обеспечения всестороннего подхода к данной проблеме, необходимо оценивать активность клеток иммунной системы активно задействованных в развитии воспалительных процессов, протекающих в некротических очагах после инфаркта миокарда [1, 2, 5]. Нейтрофильные гранулоциты являются ключевыми клетками всех воспалительных процессов, протекающих в организме. Зрелые сегментоядерные нейтрофилы в норме являются основным видом лейкоцитов, циркулирующих в крови человека, составляя от 47% до 72% общего количества лейкоцитов крови [3, 4]. Нейтрофилы способны к фагоцитозу, то есть способны поглощать лишь относительно небольшие чужеродные частицы или клетки. Они способны к внутри- и внеклеточному лизису бактерий за счет образования свободных радикалов в процессе генерации «кислородного взрыва» [3, 4]. На первом этапе «кислородный взрыва» синтезируется супероксидный анион радикал ( $O_2^-$ ), обладающий огромной реакционной способностью – первичная активная форма

кислорода (АФК). Далее он подвергается действию ферментов, что ведет к образованию токсических продуктов кислорода, которые определяются как вторичные АФК и выступают в роли бактерицидных агентов [1, 2, 3]. После фагоцитирования чужеродных частиц нейтрофилы обычно погибают, высвобождая большое количество биологически активных веществ, усиливающих воспаление и хемотаксис иммунных клеток в очаг. Метод хемилюминесценции позволяет обнаружить высоко реакционноспособные радикалы, тем самым оценить интенсивность «кислородного взрыва», скорость его развития в нейтрофильных гранулоцитах [3, 4].

**Целью** нашей работы являлось исследование хемилюминесцентной активности нейтрофильных гранулоцитов в динамике лечения постинфарктного кардиосклероза.

**Материалы и методы.** На базе ФГБНУ «НИИ медицинских проблем Севера» было обследовано 76 пациентов с постинфарктным кардиосклерозом, в возрасте 30-65 лет (средний возраст пациентов составил 46 лет). В качестве контроля обследовано 40 относительно здоровых людей аналогичного возрастного диапазона. Все исследования выполнены с информированного согласия испытуемых и в соответствии с этическими нормами Хельсинской Декларации 2001 г.

Хемилюминесцентное (ХЛ) исследование активности нейтрофилов проводится по ранее разработанным методикам. Исследование спонтанной и зимозан-индуцированной ХЛ гранулоцитов осуществляли с помощью хемилюминесцентного анализатора «CL3606М» (СКТБ «Наука», Красноярск). Результаты хемилюминесцентного анализа оценивали по следующим параметрам: время выхода на максимум ( $T_{max}$ ), максимальное значение интенсивности ( $I_{max}$ ) и площадь под хемилюминесцентной кривой ( $S$ ). Усиление хемилюминесценции, индуцированной зимозаном, оценивали отношением площади индуцированной хемилюминесценции к площади спонтанной ( $S_{инд.}/S_{спонт.}$ ) и определяли как индекс активации. Описание выборки производили с помощью подсчета медианы ( $Me$ ) и интерквартильного размаха в виде 25 и 75 перцентилей ( $C_{25}$  и  $C_{75}$ ). Достоверность различий между показателями независимых выборок оценивали по непараметрическому критерию Манна-Уитни (Mann-Whitney U test). Статистический анализ осуществляли в пакете прикладных программ “Statistica 8.0” (StatSoft Inc., 2007).

**Результаты и обсуждение.** В ходе исследования были получены статистически достоверные данные о понижении площади под кривой спонтанной люминол-зависимой хемилюминесценции ( $p < 0,01$ ) на первой неделе лечения относительно контрольных значений. Достоверных отличий на второй неделе исследования не выявлено. На первой неделе лечения люминол-зависимая хемилюминесценция, индуцированная опсонизированным зимозаном, достоверно снижена ( $p < 0,01$ ) относительно контрольных значений. При исследовании интенсивности и времени выхода на максимум люминол-зависимой спонтанной и индуцированной хемилюминесценции достоверных отличий обнаружено не было. Это указывает на сниженную продукцию АФК, вызванную метаболическим истощением нейтрофильных гранулоцитов у больных с постинфарктным кардиосклерозом. Площадь под кривой люцигенин-зависимой хемилюминесценции на первой неделе значительно снижена ( $p < 0,001$ ) по сравнению с контрольным диапазоном. На второй неделе достоверных отличий по данному параметру обнаружено не было. При оценке индуцированной зимозаном люцигенин-зависимой хемилюминесценции

значимых различий между показателями контрольной группы и пациентов с постинфарктным кардиосклерозом не обнаружено. При исследовании времени выхода на максимум было обнаружено значимое снижение люцигенин-зависимой спонтанной хемилюминесценции ( $p < 0,01$ ). Аналогичная картина наблюдалась при исследовании индуцированной зимозаном люцигенин-зависимой хемилюминесценции ( $p < 0,01$ ). На второй неделе лечения достоверные отличия не зафиксированы. В результате исследования интенсивности люцигенин-зависимой спонтанной и индуцированной хемилюминесценции достоверных отличий обнаружено не было. Это указывает на сниженный уровень синтеза супероксидного анион-радикала нейтрофильными гранулоцитами [1, 2]. Выход супероксидного анион-радикала при антигенной стимуляции опсонизированным зимозаном ускорен, что свидетельствует о наличии дополнительных метаболических резервов нейтрофильных гранулоцитов у пациентов с постинфарктным кардиосклерозом.

**Выводы.** В ходе исследования состояния нейтрофильных гранулоцитов у больных с постинфарктным кардиосклерозом установлены изменения их функциональной активности. На первой неделе лечения обнаружено значительное снижение интенсивности «кислородного взрыва» в нейтрофильных гранулоцитах крови. Это указывает на возможное истощение метаболических резервов в клетках, опосредованное спецификой развития данного заболевания. На второй неделе достоверных различий в группе больных с постинфарктным кардиосклерозом не обнаружено, что указывает на развитие компенсаторных процессов и эффективность проводимой терапии.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Савченко А. А. Особенности системы гемостаза и хемилюминесцентной активности нейтрофильных гранулоцитов у больных с острым коронарным синдромом // Сибирское медицинское обозрение, 2012. С. 10.
2. Славинский А. А. Активированные нейтрофилы при остром инфаркте миокарда // Международный журнал экспериментального образования, 2010. № 7, С. 63-65.
3. Владимиров Ю. А., Проскурнина Е. В. Свободные радикалы и клеточная хемилюминесценция // Успехи биологической химии, 2009. т. 49, С. 341-388.

4. Савченко А. А., Борисов А. Г. Основы клинической иммунометаболической Новосибирск, «Наука», 2012. С. 263.
5. Zhou X., Yun J. L., Han Z. Q. et al. Postinfarction healing dynamics in the mechanically unloaded rat left ventricle // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 2011. Vol. 300, № 5, P. 1863-1874.

## THE RESEARCH OF CHEMILUMINESCENT ACTIVITY OF NEUTROPHILS DURING THE TREATMENT MYOCARDIAL INFARCTION

Krasnova L. V., Belenyuk V. D., Gvozdyov I. I., Savchenko A. A.

*FSSI "Scientific Research Institute of Medical Problems of the North", Krasnoyarsk, Russia*

Myocardial infarction as a form of coronary disease has exceptional prevalence among the population of the Russian Federation. For a comprehensive study of the problem was analyzed chemiluminescent activity of neutrophilic granulocytes in patients with postinfarction atherosclerosis. Showed a statistically significant decrease in the efficiency of oxygen explosion, actively involved in the inflammatory processes that occur in this disease relative to the control values.

*Keywords:* neutrophils, chemiluminescence, atherosclerosis.

---

---

## УРОВЕНЬ ИЛ-1 $\beta$ И ФНО $\alpha$ В СУПЕРНАТАНТАХ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР У ДЕТЕЙ С ЮВЕНИЛЬНЫМ ИДИОПАТИЧЕСКИМ АРТРИТОМ И РЕАКТИВНЫМ АРТРИТОМ

Криволапова И. М.<sup>1,2</sup>, Пашнина И. А.<sup>1,2</sup>, Черешнев В. А.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Отдел клинической иммунологии, Областная детская клиническая больница № 1;

<sup>2</sup>Лаборатория иммунологии воспаления, Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, Екатеринбург, Россия

Обследованы дети 6–17 лет с ЮИА (n=57), реактивным артритом (n=12) и условно здоровые дети соответствующего возраста (n=31, контроль). Спонтанную и ФГА-стимулированную концентрацию ИЛ-1 $\beta$  и ФНО $\alpha$  в супернатантах клеточных культур исследовали методом ИФА. Выявлено увеличение спонтанной и стимулированной продукции ФНО $\alpha$  иммунокомпетентными клетками у детей с ЮИА и РеА по сравнению с контролем. Для ИЛ-1 $\beta$  также отмечено увеличение спонтанной продукции у детей с ЮИА и РеА, тогда как синтез этого цитокина при стимуляции митогеном был ниже, чем в контрольной группе.

*Ключевые слова:* цитокины, ювенильный идиопатический артрит, реактивный артрит.

Одной из актуальных проблем современной педиатрии является диагностика и лечение воспалительных заболеваний суставов. В этой группе заболеваний наиболее распространенным является аутоиммунное поражение суставов – ювенильный идиопатический артрит (ЮИА) [1]. В настоящее время активно исследуется цитокиновый профиль у детей с ЮИА, также как у взрослых больных с ревматоидным артритом [2, 3]. Определение уровня провоспалительных цитокинов, в част-

ности ИЛ-1 $\beta$  и ФНО $\alpha$ , при ЮИА значимо для оценки активности заболевания, а также эффективности антицитокиновой терапии [4]. Однако результаты разных авторов, касающиеся определения концентраций цитокинов, противоречивы [3]. Остаются малоизученными особенности цитокиновой продукции при реактивном артрите (РеА) – заболевании суставов, близком к ЮИА по клиническим проявлениям и имеющем в своем патогенезе инфекционную и аутоиммунную составляющую

щие. Наиболее часто концентрации цитокинов определяются в сыворотке крови, реже в синовиальной жидкости, однако, в литературных источниках представлены лишь ограниченные данные о способности иммунокомпетентных клеток к выработке цитокинов при стимуляции *in vitro*.

Целью нашей работы явилось определение спонтанного и стимулированного уровней ИЛ-1 $\beta$  и ФНО $\alpha$  в супернатантах культур клеток цельной крови у детей с ювенильным идиопатическим артритом и с реактивным артритом.

Обследованы дети 6–17 лет с ЮИА (n=57), РеА (n=12) и условно здоровые дети соответствующего возраста без признаков аутоиммунных заболеваний (n=31, контроль). Группу с ЮИА составили дети с полиартритом (n=17) и олигоартритом (n=40). Забор крови для исследований проводился в утренние часы строго натощак. Для определения содержания цитокинов в супернатантах клеточных культур цельную кровь разводили 1:9 глутаминсодержащей средой RPMI-1640 (Пан-Эко, Россия). Разведенную кровь инкубировали по 500 мкл в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при температуре 37 °С в течение 24 ч в присутствии фитогемагглютина (ФГА) в конечной концентрации 20 мкг/мл и без стимулятора. Концентрацию ИЛ-1 $\beta$  и ФНО $\alpha$  в супернатантах исследовали методом ИФА (Вектор-Бест, Россия). Для оценки значимости различий между группами использовали непараметрический критерий Манна-Уитни, результаты представлены в виде медианы. Статистическая обработка выполнена с использованием программы Statistica 6.0.

При определении спонтанной и стимулированной продукции ИЛ-1 $\beta$  и ФНО $\alpha$  у детей с олиго- и полиартрикулярными вариантами ЮИА различий не обнаружено. Это послужило основанием для объединения всех больных с ювенильным идиопатическим артритом в одну группу. Выявлено статистически значимое увеличение спонтанной продукции ИЛ-1 $\beta$  и ФНО $\alpha$  в группе детей с ЮИА (9,0 пг/мл, p<0,05 и 3,0 пг/мл, p<0,001, соответственно) по сравнению с контрольной группой (2,0 пг/мл и 0,4 пг/мл, соответственно). У детей с реактивным артритом концентрации данных цитокинов также были повышены, хотя достоверные различия с условно здоровыми детьми были обнаружены только для ФНО $\alpha$  (2,5 пг/мл, p<0,05), концентрация ИЛ-1 $\beta$  составила 8,0 пг/мл.

Неоднозначные результаты получены при определении ФГА-стимулированного уровня ИЛ-1 $\beta$  и ФНО $\alpha$ . Стимулированная продукция ИЛ-1 $\beta$  была достоверно ниже у пациентов с ЮИА (375 пг/мл, p<0,01) и РеА (241,5 пг/мл, p<0,05), чем у детей из контрольной группы (555,0 пг/мл). В то же время продукция ФНО $\alpha$  у больных с ЮИА и РеА при стимуляции клеток крови митогеном была существенно увеличена (296,0 пг/мл, p<0,05 и 405,0 пг/мл, p<0,01, соответственно) по сравнению с контролем (250 пг/мл).

Так как наибольшей способностью к продукции данных провоспалительных цитокинов среди клеток крови обладают моноциты [3], то разница между группами потенциально может быть обусловлена содержанием разного количества этих клеток в образцах крови. Но, согласно нашим предварительным исследованиям, у больных с ЮИА и РеА абсолютное количество моноцитов, как и общее количество лейкоцитов, не отличалось от такового у условно здоровых детей.

Таким образом, выявлено увеличение спонтанной и ФГА-стимулированной продукции клетками крови ФНО $\alpha$  у больных с ЮИА и РеА по сравнению с условно здоровыми детьми. Для ИЛ-1 $\beta$  у детей с заболеваниями суставов также отмечены повышенные по сравнению с контролем спонтанные концентрации, тогда как синтез этого цитокина при стимуляции митогеном был ниже, чем у здоровых детей. Выявление высоких спонтанных концентраций ИЛ-1 $\beta$  и ФНО $\alpha$  при ЮИА и РеА свидетельствует о наличии у этих больных предшествующей активации иммунокомпетентных клеток, приводящей к усилению их способности вырабатывать данные цитокины. Сниженная продукция ИЛ-1 $\beta$  после стимуляции ФГА у больных с ЮИА и РеА по сравнению со здоровыми детьми, указывает на истощение резервов функциональной активности клеток. Нами ранее выявлено, что увеличение количества Т-лимфоцитов, экспрессировавших ранний активационный маркер CD69, в ответ на стимуляцию ФГА у больных с ЮИА и РеА было существенно слабее, чем у здоровых детей [5]. Соответственно, функциональные возможности лимфоцитов крови при воспалительных заболеваниях суставов у детей также были снижены. Однако стимулированная продукция ФНО $\alpha$  при ЮИА и РеА была выше контрольных уровней. Необходимы дальней-

шие исследования для выяснения причин, которые приводят к разной интенсивности синтеза исследованных цитокинов при стимуляции. Схожие результаты определения спонтанной и стимулированной продукции ИЛ-1 $\beta$  и ФНО $\alpha$  при ЮИА и РеА свидетельствуют об общности патогенеза этих заболеваний.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алексеева Е. И., Литвицкий П. Ф. Ювенильный ревматоидный артрит: этиология, патогенез, клиника, алгоритмы диагностики и лечения. ВЕДИ, Москва 2007, 368.
2. Глазанова Т. В., Бубнова Л. Н., Мазуров В. И. Цитокины и воспаление 2002, 1.
3. Федоров Е. С., Салугина С. О., Кузьмина Н. Н. Научно-практическая ревматология 2009, 3, 74-89.
4. Жолобова Е. С., Конопелько О. Ю., Розвадовская О. С., Ельяшевич В. Я., Николаева М. Н. Научно-практическая ревматология 2013, 51 (1), 44-47.
5. Пашнина И. А. Российский иммунологический журнал 2014, Т 8 (17), 4, 965-973.

### THE LEVELS OF IL-1 $\beta$ AND TNF $\alpha$ IN THE SUPERNATANTS OF THE CELL CULTURE IN CHILDREN WITH JUVENILE IDIOPATHIC ARTHRITIS AND REACTIVE ARTHRITIS

Krivolapova I. M.<sup>1,2</sup>, Pashnina I. A.<sup>1,2</sup>, Chereshev V. A.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Regional Child's Clinical Hospital № 1; <sup>2</sup>Institute of Immunology and Physiology Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, Russia

Children with juvenile idiopathic arthritis (n=57), reactive arthritis (n=12) and healthy children (n=31) of 6–17 years old were examined. Spontaneous and FGA-stimulated concentration of IL-1 $\beta$  and TNF $\alpha$  in the supernatants of the cell culture were determined by ELISA. Spontaneous and FGA-stimulated production of TNF $\alpha$  by immunocompetent cells was increased in children with juvenile idiopathic arthritis and reactive arthritis in comparison with control. Spontaneous IL-1 $\beta$  production was also increased in children with joints diseases whereas the stimulated production of this cytokine was decreased in comparison with healthy children.

### ВЛИЯНИЕ ГЕРПЕСВИРУСОВ НА ПРОДУКЦИЮ ИНТЕРФЕРОНОВ ПРИ МИАЛГИЧЕСКОМ ЭНЦЕФАЛОМИЕЛИТЕ

Дидковский Н. А.<sup>1</sup>, Малашенкова И. К.<sup>2</sup>, Крынский С. А.<sup>2</sup>,  
Огурцов Д. П.<sup>1</sup>, Хайлов Н. А.<sup>2</sup>, Добровольская Е. И.<sup>2</sup>, Гурская О. Г.<sup>1</sup>,  
Жарова М. А.<sup>1</sup>, Зуйков И. А.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБУН НИИ физико-химической медицины ФМБА России; <sup>2</sup>НИЦ «Курчатовский Институт», Москва, Россия

Проводилось исследование вирусной нагрузки в слюне, показателей клеточного иммунитета и уровня цитокинов в сыворотке крови у больных МЭ/СХУ. Выявлено повышение частоты активной герпесвирусной моно- и микст-инфекции. Высокое число копий вируса Эпштейна-Барр в слюне ассоциировалось со снижением уровня Th1-цитокинов в сыворотке. Таким образом, у больных МЭ/СХУ с активной ВЭБ-инфекцией, отмечаются признаки недостаточности цитокинов Th1-ответа.

**Ключевые слова:** вирус Эпштейна-Барр, синдром хронической усталости, цитокины.

Миалгический энцефаломиелит/синдром хронической усталости (МЭ/СХУ) – хроническое неврологическое заболевание с иммунными расстройствами (G93.3 по МКБ-10).

Исследователи отмечают гетерогенность МЭ/СХУ как нозологической единицы [1, 2]. Многие случаи характеризуются активной герпесвирусной инфекцией, в частности инфекцией вирусом Эпштейна-Барр (ВЭБ) и иммунными нарушениями (снижение клеточной цитотоксичности, снижение уровня Th1-цитокинов IFN $\gamma$  и IL-12). Эти изменения сопровождаются признаками системного воспаления (повышение провоспалительных цитокинов IL-1, IL-6, IL-8, TNF $\alpha$ , увеличение продукции свободных радикалов фагоцитами) [1, 2].

В патогенезе заболеваний, вызванных ВЭБ, имеет значение нарушение баланса Th1- и Th2-звеньев адаптивного иммунного ответа. Данные литературы указывают, что хотя при острой ВЭБ-инфекции (инфекционный мононуклеоз) преобладает Th1-иммунный ответ, некоторые хронические заболевания, ассоциированные с ВЭБ (лимфома Беркитта, хроническая активная ВЭБ-инфекция) сопровождаются нарушением Th1-иммунного ответа и выраженным преобладанием Th2-ответа [3].

Иммуносупрессия Th1-ответа при указанных формах хронической ВЭБ-инфекции связана в основном с воздействием вирусных белков на активность интерферонов (за счет угнетения синтеза самих интерферонов, подавления транскрипционной индукции и активности интерферон-стимулируемых белков). Белок EBNA2, кодируемый ВЭБ, связывает вирусные нуклеиновые кислоты и препятствует их взаимодействию с интерферон-стимулируемым белком OAS. Синтезируемые ВЭБ некодирующие РНК EBEB-1 и EBEB-2 подавляют активность клеточной протеинкиназы R, являющейся сенсором чужеродных нуклеиновых кислот и индуктором интерфероновых каскадов. Вирусный белок vIL-10, схожий с человеческим интерлейкином-10 (IL-10), вызывает сдвиг защитных реакций в сторону Th2-ответа. Направленность механизмов избегания иммунного ответа, используемых ВЭБ, на взаимодействие клеток иммунной системы, прежде всего на интерфероновую систему, позволяет этому вирусу оказывать системное иммуносупрессивное действие. Изучение связи иммунных нарушений при МЭ/СХУ с репликативной активностью герпесвирусной инфекции важно для понимания патогенеза заболевания и для повышения эффективности терапии.

В настоящей работе проведено определение вирусной нагрузки в слюне, показателей

клеточного иммунитета и уровня цитокинов в сыворотке крови у 53 больных МЭ/СХУ (30 муж., 23 жен., средний возраст 34 $\pm$ 5 лет). Контролем служили 30 условно здоровых добровольцев. Использовали ПЦР для количественного определения ВЭБ, герпесвирусов человека 6 и 7 типов (HHV-6, HHV-7). Показатели клеточного иммунитета исследовали с помощью проточной цитометрии. Применяли иммуноферментный анализ для изучения уровня Th1-цитокинов (IFN $\gamma$ , IL-2, IL-15) и провоспалительных цитокинов (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ) в сыворотке. Критерием высокой репликации ВЭБ в слюне было число копий ДНК вируса более 4 lg копий/мл. Для статистической обработки применяли критерий Стьюдента, критерий хи-квадрат и коэффициент корреляций Пирсона. Межгрупповые различия считали достоверными при  $p < 0.05$ .

Исследование вирусной нагрузки показало, что частота обнаружения ВЭБ при МЭ/СХУ была выше, чем в контрольной группе, составляя 62.3%. Частота обнаружения HHV-6 при МЭ/СХУ составила 53.2%, а HHV-7 – 97.2%. Больные МЭ/СХУ имели высокую степень репликации ВЭБ в слюне в 41.5% случаев, в то время как в контрольной группе эта частота составила 20% случаев. Высокая репликация ВЭБ у больных ассоциировалась с увеличением частоты микст-инфекции герпесвирусами ВЭБ и HHV-6: микст-инфекция была обнаружена у 54.5% больных МЭ/СХУ с низкой репликацией ВЭБ и у 77.2% больных с высокой репликацией ВЭБ.

У 34 пациентов с МЭ/СХУ оценивали концентрацию ДНК HHV-7 в слюне. Средняя концентрация этого вируса составила 4.88 $\pm$ 0.32 lg копий/мл. Концентрация HHV-7 различалась в зависимости от уровня репликации ВЭБ: при низкой репликации ВЭБ средняя концентрация HHV-7 составила 4.32 $\pm$ 0.34 lg копий/мл, а при высокой репликации – 5.53 $\pm$ 0.39 lg копий/мл ( $p = 0.00007$ ). При этом корреляция lg концентрации ВЭБ и HHV-7 составила +0.7 ( $p < 0.01$ ).

Исследование Th1-цитокинов показало, что высокое число копий вируса ВЭБ в слюне у больных ассоциировалось со снижением уровня Th1-цитокинов в сыворотке, а также с тенденцией к снижению числа НК-клеток. Так, уровень цитокина IFN $\gamma$  составил 203.85 $\pm$ 91.14 пг/мл при низкой репликации вируса и 69.07 $\pm$ 41.35 пг/мл при высокой репликации ( $p = 0.006$ ). Уровень цитокина IL-2



составил  $3.26 \pm 1.66$  пг/мл и  $1.39 \pm 0.86$  пг/мл, соответственно ( $p=0.03$ ). Содержание НК-клеток было  $19.37 \pm 6.23\%$  и  $12.29 \pm 0.82\%$  ( $p=0.03$ ). Кроме того, у больных была выявлена отрицательная корреляционная зависимость между уровнем Th1-цитокинов и числом копий ВЭБ в слюне: между IFN $\gamma$  и уровнем ВЭБ ( $r=-0.35$ ), между IL-2 и уровнем ВЭБ ( $r=-0.44$ ), между IL-15 и уровнем ВЭБ ( $r=-0.59$ ).

В то же время выделение ВЭБ со слюной сопровождалось у пациентов с более высоким уровнем провоспалительного цитокина TNF $\alpha$  ( $p=0.0498$ ). Кроме того, у пациентов, выделяющих вирус, частота обнаружения TNF $\alpha$  была выше почти в 4 раза, составляя 79.31% (при отсутствии выделения вируса – 20%),  $p<0.01$ . Таким образом, наличие ВЭБ в слюне у большинства пациентов ассоциировалось с обнаружением TNF $\alpha$  в сыворотке, что свидетельствует о системной воспалительной реакции.

Ассоциаций между количественными показателями репликации HHV-6 и исследованными показателями иммунитета не было обнаружено.

**Выводы.** При МЭ/СХУ отмечается повышение частоты активной герпесвирусной моно- и микст-инфекции с выделением ВЭБ и HHV-6

в слюне. Также у пациентов увеличена частота активной ВЭБ-инфекции с репликацией вируса в слюне более  $4 \lg$  копий/мл. Пациенты с высокой и низкой репликацией ВЭБ различаются по частоте микст-инфекции с выделением ВЭБ и HHV-6, а также по уровню репликации герпесвируса HHV-7. Обнаруженная связь концентрации вируса ВЭБ в слюне с системным уровнем Th1-цитокинов свидетельствует о том, что у больных МЭ/СХУ с активной ВЭБ-инфекцией, может присутствовать недостаточность Th1-ответа, описанная при других клинических формах ВЭБ-инфекции. В лечении этой категории больных МЭ/СХУ может являться патогенетически обоснованным использование аномальных нуклеотидов и рекомбинантных аналогов Th1-цитокинов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Didkovsky N. A. et al. Russian Allergological Journal. 2011. № 4, 1. P. 214-216.
2. Chapenko S., Krumina A., Logina I., et al. AdvVirology. 2012; 2012:205085. doi: 10.1155/2012/205085. Epub 2012 Aug 13.
3. Lubega J. Infect Agent Cancer. 2007 May 17;2:10.
4. Mohr IJ, Peery T, Mathews MB. Cold Spring Harbor, NY, 2007: Cold Spring Harbor Press, pp 545-599.

### HERPESVIRUSES AND IMMUNE DISTURBANCES IN MYALGIC ENCEPHALOMYELITIS

Didkovsky N. A.<sup>1</sup>, Malashenkova I. K.<sup>2</sup>, Krynskiy S. A.<sup>2</sup>, Ogurtsov D. P.<sup>1</sup>, Hailov N. A.<sup>2</sup>,  
Dobrovolskaya E. I.<sup>2</sup>, Gurskaya O. G.<sup>1</sup>, Zharova M. A.<sup>1</sup>, Zuikov I. A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>FSBIS NRC of physical-chemical medicine FMBA of Russia; <sup>2</sup>NRC "Kurchatov Institute",  
Moscow, Russia

Studies of immune disturbances in myalgic encephalomyelitis (ME) are important for understanding the pathogenesis of this disease better and for choosing correct therapies. We researched quantitatively viral load in the saliva, cell-mediated immunity and cytokine levels in the serum in patients with ME. The patients had higher frequency of active herpesvirus monoinfection and mixed infection. Higher Epstein-Barr virus (EBV) viral load in the saliva was associated with lower Th1-cytokine serum levels. The results show that ME associated with active EBV infection is characterized by a deficiency in Th1-cytokines of adaptive immune response.

*Key words:* Epstein-Barr virus, myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome, cytokines.

## ОСОБЕННОСТИ ИММУННОЙ И НЕЙРОЭНДОКРИННОЙ РЕГУЛЯЦИИ У ДЕТЕЙ, ПРОЖИВАЮЩИХ В УСЛОВИЯХ АЭРОТЕХНОГЕННОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ ФЕНОЛА, МЕТАНОЛА И ФОРМАЛЬДЕГИДА

Ланин Д. В.<sup>1,2</sup>, Зайцева Н. В.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения»; <sup>2</sup>ФГБОУ ВПО «Пермский государственный национальный исследовательский университет», Пермь, Россия

У детей при аэротехногенном воздействии фенола, метанола и формальдегида найдена активация механизмов естественного и угнетение маркеров приобретенного иммунитета, показано значимое понижение кортизола. В условиях воздействия техногенных химических факторов окружающей среды происходит реаранжировка и трансформация взаимодействий внутри нейроэндокринной и иммунной систем.

*Ключевые слова:* иммунная, нейроэндокринная системы, химические факторы среды обитания.

**Актуальность.** В настоящее время более 55 млн. человек в России проживают в городах с высоким уровнем загрязнения. Проживание в условиях повышенной экспозиции химических веществ и соединений является фактором риска нарушений здоровья связанных с изменениями и нарушениями регуляторных и адаптивных систем [1, 2, 3]. Однако вопросы анализа системных регуляторных нарушений иммунной и нейроэндокринной систем, связанных с воздействием внешнесредовых химических факторов риска до настоящего времени полностью не решены.

**Цель исследования** – выявить особенности иммунной и нейроэндокринной регуляции у детей, проживающих в условиях аэротехногенного воздействия фенола, метанола и формальдегида.

**Материалы и методы.** В качестве объектов исследования выбраны 494 ребенка в возрасте 3-6 лет (девочек – 49%, мальчиков – 51%), посещающие детские дошкольные учреждения. Экспонированная группа – 270 детей, проживающих на территории Пермского края с техногенной химической нагрузкой, в сравнении с 224 детьми, проживающими на территории Пермского края с удовлетворительной санитарно-гигиенической ситуацией (неэкспонированная группа). Оценка качества ат-

мосферного воздуха проводилась по данным собственных, мониторинговых и натурных наблюдений. Оценка содержания химических факторов в крови проводилось методом капиллярной газовой хроматографии на хроматографе Кристалл 2000. Исследование иммунного статуса включало: CD-фенотипирование, определение относительного и абсолютного числа CD3<sup>+</sup>-, CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>-, CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>-, CD19<sup>+</sup>-, CD16<sup>+</sup>56<sup>+</sup>-лимфоцитов при помощи цитофлуориметра FACSCalibur (тест-системы «Becton Dickinson», США); определение фагоцитарной активности лейкоцитов с использованием в качестве объектов фагоцитоза формализированных эритроцитов барана, концентрации иммуноглобулинов (Ig) A, G, M методом радиальной иммунодиффузии по Манчини. Концентрацию IgE и фактора некроза опухоли-α (TNFα) определяли методом ИФА («Вектор-Бест», РФ; «Хема-Медика», РФ). Определяли содержание в сыворотке крови кортизола, тиреотропного гормона, T<sub>4</sub> свободного, серотонина (тест-системы ИФА «Хема-Медика», РФ; «IBL», «DRG Diagnostics», Германия). Оценка показателей системы крови (форменные элементы, гемоглобин) проводилась на гематологическом анализаторе Coulter Ac T 5 diff, Beckman Coulter, США. Для идентификации изменений биохимических пара-

метров проводилось определение малонового диальдегида и антиоксидантной активности плазмы по реакции с тиобарбитуровой кислотой, щелочной фосфатазы, аланинаминотрансферазы (АлАТ), аспартатаминотрансферазы (АсАТ), гамма-глутамилтрансферазы ( $\gamma$ -ГТ), альбуминов, глюкозы на автоматическом биохимическом анализаторе Konelab 20 "Thermo Fisher", Финляндия. Статистическую достоверность различий оценивали по непарному  $t$ -критерию Стьюдента. Причинно-следственные связи между воздействием химического вещества и ответной реакцией организма описывали при помощи модели логистической регрессии [4]. Для оценки изменения связей иммунной и нейроэндокринной систем использовали факторный анализ [4].

**Результаты.** Как показывает гигиеническая оценка состояния атмосферного воздуха в г. Губахе регистрировались значительные превышения гигиенических нормативов по фенолу (максимальные из разовых концентраций – 10,0 ПДК; среднесуточные концентрации – 3,5 ПДК) и формальдегиду (максимальные из разовых концентраций – 1,9 ПДК). При оценке уровня содержания токсичных соединений в крови установлено, что у детей экспонированной группы идентифицируется повышенный уровень метилового спирта и формальдегида, а также определяется высокий уровень фенола по сравнению с детьми без экспозиции ( $p < 0,05$ ). При этом необходимо отметить, что содержание в крови фенола в пять, а формальдегида в 2 раза выше у детей экспонированной группы.

При анализе маркеров эффекта со стороны регуляторных систем у детей, проживающих в условиях экспозиции метилового спирта, фенола и формальдегида имеются значительные изменения со стороны про- и антиоксидантной активности. Так в этой группе по сравнению с детьми группы без экспозиции значительно повышено содержание маркеров прооксидантной активности – малонового диальдегида (группа с экспозицией –  $3,13 \pm 0,09$ , без экспозиции –  $2,45 \pm 0,13$  мкмоль/см<sup>3</sup>,  $p < 0,0001$ ) и гидроперекиси липидов (группа с экспозицией –  $376,9 \pm 16,4$ , без экспозиции –  $327,8 \pm 14,2$  мкмоль/дм<sup>3</sup>,  $p < 0,0001$ ), при одновременном снижении интегрального показателя антиоксидативной активности плазмы (группа с экспозицией –  $38,6 \pm 1,02$ , без экспозиции –  $41,3 \pm 1,95$  у.е.,  $p = 0,02$ ). Также имеются измене-

ния, характеризующие напряженность печеночной функции и маркеров цитолитической активности. Так имеются разнонаправленные изменения общего (снижение) и прямого – (увеличение) билирубина ( $p < 0,0001$ ), снижение концентрации щелочной фосфатазы ( $p = 0,0004$ ) и АЛАТ ( $p = 0,0009$ ).

Анализ изменений адаптивных систем позволяет выявить нарушения как со стороны врожденного, так и адаптивного иммунитета. В экспонированной группе имеется активация фагоцитарной активности (повышен абсолютный фагоцитоз), а также снижение провоспалительного цитокина TNF- $\alpha$  и увеличение общего содержания лейкоцитов. Имеется снижение относительных показателей содержания Т-лимфоцитов (CD3<sup>+</sup>-лимфоцитов), а также их субпопуляций Th- (CD4<sup>+</sup>) и цитотоксических (CD8<sup>+</sup>) лимфоцитов. Также имеется тенденция к снижению сывороточного IgA. Из маркеров нейроэндокринной системы в группе наблюдения имеется значимое понижение концентрации стрессового гормона кортизола в сравнении с данным показателем у детей группы без экспозиции.

Таким образом, у детей экспонированной группы наблюдается активация прооксидантных механизмов с одновременным снижением противооксидантной активности, а также активация механизмов естественного и угнетение маркеров приобретенного иммунитета. На этом фоне происходит реаранжировка и трансформация взаимодействий внутри нейроэндокринной и иммунной систем.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Зайцева Н. В., Устинова О. Ю., Аминова А. И. Гигиенические аспекты нарушения здоровья детей при воздействии химических факторов среды обитания. – Пермь: Книжный формат, 2011. – 489 с.
2. Ланин Д. В. // Анализ риска здоровью. – 2013. – № 1. – С. 73-81.
3. Онищенко Г. Г., Зайцева Н. В., Землянова М. А. Гигиеническая индикация последствий для здоровья при внешнесредовой экспозиции химических элементов. – Пермь: Книжный формат, 2011. – 532 с.
4. Bartholomew D. J., Steele F., Galbraith J., Moustaki I. Analysis of Multivariate Social Science Data. Statistics in the Social and Behavioral Sciences Series (2nd ed.). – New York: Taylor & Francis, 2008. – 371 p.

## FEATURES OF THE IMMUNE AND NEUROENDOCRINE REGULATION IN CHILDREN LIVING UNDER CONDITIONS OF AERO EXPOSURE TO PHENOL, METHANOL AND FORMALDEHYDE

Lanin D. V.<sup>1,2</sup>, Zaitseva N. V.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>FBSI "Federal Scientific Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies";  
<sup>2</sup>FSBEI HPE "Perm State National Research University", Russia, Perm

In children with aerotechnogenic impact phenol, methanol and formaldehyde, Activation innate immunity mechanisms and inhibition adaptive immunity was found. From markers neuroendocrine regulation established significant decrease in cortisol. In the context of the impact of man-made chemical factors of the environment occurs rearrangement and transformation of interactions within the neuroendocrine and immune systems.

*Key words:* chemical environmental factors; immune and neuroendocrine systems.

## ПОДХОДЫ К МАТЕМАТИЧЕСКОМУ МОДЕЛИРОВАНИЮ МЕХАНИЗМОВ ВЗАИМОСВЯЗИ ИММУННОЙ И НЕЙРОЭНДОКРИННОЙ СИСТЕМ

Ланин Д. В., Чигвинцев В. М.

*Федеральное бюджетное учреждение науки «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения», Пермь, Россия*

В данной работе рассмотрена математическая модель, позволяющая описывать механизм регуляции элементов нейроэндокринной и иммунной систем в ответ на бактериальную инвазию, с учетом эволюции функциональных нарушений элементов. Описание взаимодействия отдельных структурных элементов рассматриваемых систем позволяет отобразить особенности происходящих процессов регуляции.

*Ключевые слова:* иммунная и нейроэндокринная системы, математическая модель.

**Актуальность.** Процессы взаимосвязи и взаиморегуляции иммунной и нейроэндокринной систем играют значительную роль в поддержании гомеостаза организма и уже на протяжении многих лет привлекают внимание исследователей [1]. Однако при изучении этих вопросов традиционно используется статистический подход, который, не смотря на ряд преимуществ при решении частных задач, является недостаточным с позиций системного анализа. Для этих целей может быть предложено использование математических моделей. Большинство работ в этой области посвящено биологическому и математическому описанию отдельных звеньев регуляторных механизмов [2, 3], существенно облегчающих понимание изучаемых

явлений, но не способных дать полного и системного представления о внутренних связях и протекающих процессах.

**Цель исследования** – построение математической модели механизмов регуляции, основанных на оси взаимодействия элементов иммунной и нейроэндокринной систем с учетом эволюции функциональных нарушений.

**Биологические основы модели. Концептуальная и математическая постановка.** Известно, что в основе механизма противодействия бактериальной инвазии лежит способность моноцитов и, в большей степени, зрелых их форм макрофагов к фагоцитозу патогенных бактерий. Поглощение комплексом «моноциты-макрофаги» инфекционных агентов сопровождается синтезом и высвобождением целого

ряда цитокинов, среди которых и провоспалительный интерлейкин-1 (IL-1). Появление в крови повышенного содержания IL-1, помимо многочисленных регуляторных эффектов, побуждает к мобилизации моноцитов в очаг воспаления, а так же через специфические рецепторы гипоталамуса стимулирует выработку рилизинг-гормона кортиколиберина. Последний, действуя на переднюю долю гипофиза, вызывает секрецию адренокортикотропного гормона (АКТГ). АКТГ, попадая в кровь, стимулирует надпочечники к выработке кортизола, повышение концентрации которого по механизму отрицательной обратной связи подавляет секрецию АКТГ и кортиколиберина, стимулирует апоптоз «моноцитов-макрофагов» и блокирует выработку IL-1. При этом указанные эффекты кортизола проявляются, начиная с некоторого нормативного уровня, и носят нелинейный характер. За счет отрицательной обратной связи, вызванной увеличением концентрации кортизола, система находится в положении равновесия. Исследуемая структура взаимодействия элементов иммунной и нейроэндокринной систем является далеко не полной и содержит только часть регуляторных механизмов, но позволяет качественно отразить суть происходящих процессов.

Представленный механизм описывает саморегулирующуюся систему, работа которой во многом зависит от функционального состояния органов (костный мозг, гипофиз, гипоталамус, надпочечники). Нарушение функций органов нейроэндокринной и иммунной систем может привести к сбою регуляции и дисбалансу показателей. Для описания явления снижения функциональной активности органов, используется математическая модель эволюции нарушений функций органов и систем организма [4]. Эволюция нарушений функций определяется внешними по отношению к рассматриваемым органам воздействиями и внутренними нарушениями за счет естественных причин (старения).

Взаимодействия между элементами регуляторных систем описывается набором из шести уравнений с начальными условиями, и представляет собой задачу Коши, записанную для системы обыкновенных дифференциальных уравнений первого порядка с запаздывающим аргументом. Идентификация параметров модели выполнена из условий течения стрептококковой легочной инфекции при изменениях продукции костным мозгом моноцитов.

**Результаты моделирования.** Для апробации модели поставлен численный эксперимент с тремя возможными сценариями развития событий, отличающимися по степени повреждения способности костного мозга к продукции моноцитов-макрофагов. Каждый сценарий предполагает выведение системы из состояния равновесия заданием начального уровня бактерий. На начальном этапе (в течение 2-3 суток) по всем сценариям наблюдается рост количества «макрофагов-моноцитов» и запуск регуляторных механизмов.

При реализации первого сценария, система через 4-5 дней приходит в состояние устойчивого равновесия, что отвечает подавлению бактериального заражения и приведению показателей в нормативное состояние. Что соответствует в клинике либо отсутствию симптоматики болезни или острому воспалению, заканчивающемуся быстрым выздоровлением. Второй сценарий симулирует незначительное нарушение синтетической функции костного мозга, когда осуществляется баланс двух процессов: размножения бактерий и их уничтожения макрофагами. При этом роста числа бактерий не происходит и сохраняется напряжение иммунной системы. Примером таких состояний может быть обострение или ремиссия хронического заболевания. В третьем сценарии симулируется значительное нарушение продукции моноцитов-макрофагов костным мозгом. Наблюдается неограниченный рост числа бактерий, связанный со снижением числа моноцитов-макрофагов, что обусловлено снижением их продукции костным мозгом. Это приводит к угнетению всех регуляторных показателей, проявляющихся в тяжелых острых состояниях или тяжелом обострении хронической инфекции, способных приводить к смерти.

**Вывод.** Построена математическая модель достаточно адекватно описывающая процессы многокомпонентного взаимодействия регуляторных систем при воспалительных реакциях бактериального генеза. Данная модель может служить основой для дальнейшего углубленного изучения влияния различных внутренних и внешних факторов на инфекционную заболеваемость населения.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ланин Д. В., Зайцева Н. В., Долгих О. В. // Усп. совр. биол. – 2011. – Т. 131, № 2. – С. 122-134.

2. Berkenbosch F, van Oers J, del Rey A, Tilders F, Besedovsky H // Science.– 1987.– № 238.– С. 524-526.
3. Tan J, Pan R, Qiao L, Zou X, Pan Z [Электронный ресурс] // PLoS ONE.– 2012.– № 7 (10).– URL: <http://journals.plos.org/plosone/articleid=10.1371/journal.pone.0048114>. (дата обращения 15.03.2015).
4. Трусов П. В., Зайцева Н. В., Кирьянов Д. А., Камалтдинов М. Р., Цинкер М. Ю., Чигвинцев В. М., Ланин Д. В. // Математическое моделирование и биоинформатика.– 2012.– № 2.– С. 589-610.

## APPROACHES TO MATHEMATICAL MODELING OF INTERACTION BETWEEN IMMUNE AND NEUROENDOCRINE SYSTEMS

Lanin D. V., Chigvintsev V. M.

*FBSI "Federal Scientific Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies", Perm, Russia*

This paper presents mathematical models of the immune and neuroendocrine system functioning in response to bacterial invasion, taking into account the evolution of functional disorders in structural elements. The features of regulation processes are shown through their interaction.

## ОСОБЕННОСТИ ГУМОРАЛЬНОГО ЗВЕНА ИММУНИТЕТА И ЦИТОКИНОВОГО ПРОФИЛЯ У БОЛЬНЫХ ИНФЕКЦИОННОЙ ЭКЗЕМОЙ

Лукьянчикова Л. В., Лысенко О. В.

*ГБОУ ВПО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» МЗ РФ; ГБУЗ «Областной кожно-венерологический диспансер № 3», Челябинск, Россия*

**Цель исследования** – Изучить изменения в некоторых показателях гуморального звена иммунитета и цитокинового профиля у больных инфекционной экземой, для дальнейшей оптимизации терапии заболевания. **Материал и методы.** Проведено исследование 100 больных инфекционной экземой, в сравнении с 30 условно-здоровыми лицами. Производилась оценка Ig A, Ig M, IgG, IgE, ЦИК, концентрации цитокинов IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-17, а также лактоферрина. **Результаты.** У больных инфекционной экземой в процессе развития заболевания сформировалось значительное изменение иммунной реактивности. Наиболее существенные отклонения от показателей здорового контингента выявлены в содержании ЦИК, IgA, IgM, IgG, IL-2 и IL-17.

*Ключевые слова:* инфекционная экзема, цитокиновый профиль, гуморальный иммунитет.

**Введение.** Экзема – острое или хроническое рецидивирующее аллергическое заболевание кожи, формирующееся под влиянием экзогенных и эндогенных триггерных факторов и характеризующееся появлением полиморфной сыпи, острой воспалительной реакцией, обусловленной серозным воспалением кожи, и сильным зудом. [1]. Среди множественных форм экземы наиболее частой разновидностью является микробная, составляющая более 50% всех клинических вариантов дерматоза. [1, 2, 3, 4]

Важность иммунных нарушений в патогенезе экземы не вызывает сомнений. [1, 2, 3, 5] Определено значение иммуногенетических особенностей (ассоциации с антигенами HLA-B22 и HLA-C1), иммунного воспаления в коже на фоне подавления клеточного и гуморального иммунитета, угнетения неспецифической резистентности. Участие Т-лимфоцитов, в частности Th1, индуцирующих целый ряд провоспалительных цитокинов, таких как IL-1, IL-2, TNF $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , дало основание некоторым авторам назвать это забо-

ление «цитокиновым дерматозом». Кроме того, иммунные девиации у больных экземой выявлены в самой коже, где отмечаются реакции, частично медирированные Th2 лимфоцитами (на ранних стадиях) и Th1 лимфоцитами (на поздних стадиях) [2, 3, 5]. В конечном итоге, выход простогландинов, лейкотриенов, гистамина и т.д., вызывающих развитие в тканях воспаления, клинически проявляется ранним аллергическим ответом в виде гиперемии, отека, зуда [2, 3, 5].

Не меньший интерес вызывают изменения гуморального звена и цитокинового профиля у больных инфекционной экземой, девиации которых изучены в меньшей степени.

**Цель исследования:** изучить изменения в некоторых показателях гуморального звена иммунитета и цитокинового профиля у больных инфекционной экземой, для дальнейшей оптимизации терапии заболевания.

**Материалы и методы.** Для достижения поставленной цели в 2009–2013 г. проведено исследование иммунного статуса у 100 пациентов с инфекционной экземой, в сравнении с 30 условно-здоровыми лицами.

Определение в сыворотке крови концентрации иммуноглобулинов классов А, М, G проводилось с помощью иммуноферментного анализа с тест-системами производства ВЕКТОР БЕСТ (г. Новосибирск). Концентрация общего иммуноглобулина Е в сыворотке крови выявлялась методом твердофазного иммуноферментного анализа («Вектор-Бест», г. Новосибирск). Уровень IL-17, IL-4, IFN- $\gamma$  смотрели методом иммуноферментного анализа в микропланшетном формате с регистрацией результатов на ридере «MultiscanPlus» фирмы «Labsystems» (Финляндия) с применением реактивов фирмы ООО «Цитокин» (г. Санкт-Петербург).

Статистический анализ данных проводили с помощью пакетов прикладных программ Microsoft Excel 2007 и STATISTICA 6.0 (for Windows; «StatSoft, Inc.», 2001).

**Результаты и обсуждение.** Исследование некоторых показателей гуморального иммунитета и цитокинового профиля у больных инфекционной экземой выявило широкий спектр девиаций различного уровня.

Уровень циркулирующих иммунных комплексов в группе наблюдения был достоверно увеличен и достиг –  $46,31 \pm 1,98$ , что в два раза выше его количества в контрольной группе.

При инфекционной экземе наблюдалось снижение содержания Ig A в сравнении с контролем ( $0,89 \pm 0,04$  г/л и  $1,63 \pm 0,01$  г/л соответственно,  $p < 0,01$ ), подобные же отклонения имелись в отношении Ig M ( $1,01 \pm 0,04$  г/л и  $1,18 \pm 0,09$  г/л, соответственно,  $p < 0,05$ ). Уровень IgG, напротив оказался увеличенным ( $19,31 \pm 0,23$  г/л, контроль  $11,31 \pm 0,21$  г/л,  $p < 0,001$ ).

Содержание в сыворотке крови IgE было повышено у лиц с инфекционной экземой ( $10,32 \pm 1,32$  МЕ/мл), в сравнении с контролем ( $1,68 \pm 0,22$  МЕ/мл).

Учитывая патогенетическую значимость в развитии инфекционной экземы, в сыворотке крови определена концентрация IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-17, а также лактоферрина.

Выявлено достоверно большее содержание IL-2 ( $4,62 \pm 0,05$  пг/мл, по сравнению с контролем  $1,63 \pm 0,12$  пг/мл,  $p < 0,01$ ), что может свидетельствовать об активном островоспалительном процессе на системном уровне.

Содержание IL-4 при инфекционной экземе не отличалось от показателей контроля.

Отмечено достоверное повышение уровня IL-17 ( $20,78 \pm 0,93$  пг/мл, относительно показаний контроля  $16,32 \pm 1,77$  пг/мл,  $p < 0,001$ ) что, вероятно, связано с участием данного цитокина в развитии аллергического воспаления, а также с тем, что основной физиологической функцией этого цитокина является защита от инфекций.

Количество IFN- $\gamma$  оказалось также достоверно повышенным ( $24,30 \pm 1,23$  пг/мл) по сравнению с контролем ( $13,04 \pm 2,29$  пг/мл).

Содержание лактоферрина в сыворотке крови было, напротив, достоверно ниже, чем в контрольной группе и соответствовало  $897 \pm 30,10$  нг/мл при контроле  $1136 \pm 90,92$  нг/мл. Возможно, в некоторых случаях данное снижение может нарушать устойчивость к развитию бактериальной инфекции у пациентов с инфекционной экземой.

Таким образом, у больных инфекционной экземой в процессе развития заболевания сформировалось значительное изменение иммунной реактивности. Наиболее существенные отклонения от показателей здорового контингента выявлены в содержании ЦИК, IgA, IgM, IgG, IL-2 и IL-17.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Охлопков В. А. Федеральные рекомендации по ведению больных экземой. М., 2013

1. Бутов Ю. С., Родина Ю. А. // Российский журнал кожных и венерических болезней. – 2007. – № 3. – С. 33-37.
2. Потекаев Н. С. // Клиническая дерматология и венерология. – 2009. – № 1. С. 67-73.
3. Данилов С. И., Нечаева О. С., Пирятинская А. Б. // Российский журнал кожных и венерических болезней. – 2005. – № 1. – С. 60-62.
4. Galli, E., Ciucci, A., Cersosimo, S. et al. // Int J Immunopatol Pharmacol. – 2010 Apr – Jun. – № 23 (2) /-P.671–5.

## FEATURES HUMORAL IMMUNITY AND CYTOKINE PROFILE IN PATIENTS WITH INFECTIOUS ECZEMA

Lukyanchikova L., Lysenko O.

«South Ural State Medical University» Ministry of Health of the Russian Federation, Chelyabinsk;  
GBUZ «Regional Dermatovenereology Dispensary № 3»

The aim of the study was to examine the changes in some indicators of humoral immunity and cytokine profile in patients with infectious eczema, for further optimization of the therapy of the disease. Material and methods. A study of 100 patients with infectious eczema, in comparison with 30 healthy individuals. The assessment was made Ig A, Ig M, IgG, IgE, CEC, the concentration of cytokines IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-17, as well as lactoferrin. Results. In patients with infectious eczema in the process of development of the disease formed a significant change in immune reactivity. The most significant deviations from that of a healthy contingent identified in the content of the CEC, IgA, IgM, IgG, IL-2 and IL-17.

*Keywords:* infectious eczema, cytokine profile, humoral immunity.

## ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ МАРКЕРОВ ВОСПАЛЕНИЯ ПРИ ХРОНИЧЕСКИХ ЦЕРЕБРОВАСКУЛЯРНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

Мавзютова Г. А., Лукманова Л. З., Хакимова Р. А.

ГБОУ ВПО Башкирский государственный медицинский университет,  
Уфа, Россия

В данной статье представлен иммуновоспалительный аспект дислипидемии, включающий характеристику содержания ФНО- $\alpha$ , ИЛ-6, ИЛ-10, МСР-1, С-РБ при церебральном атеросклерозе, и приведены данные собственных исследований.

*Ключевые слова:* воспалительные маркеры атеросклероза, дислипидемия, цитокины, хронические цереброваскулярные заболевания.

**Актуальность.** Смертность от цереброваскулярных заболеваний (ЦВЗ) в России составляет 233 случая на 100 000 человек (31%) и находится на втором месте после ишемической болезни сердца [4]. Хронические ЦВЗ, к которым относятся начальные проявления недостаточности кровоснабжения мозга и дисциркуляторная энцефалопатия (ДЭ), с одной стороны, являются фактором риска развития инсульта, а с другой – причиной постепенно нарастающего неврологических и психиче-

ских расстройств, которые при ДЭ могут быть причиной тяжелой инвалидизации больных. Основными причинами, которые обуславливают возникновение и развитие ДЭ у лиц пожилого возраста, являются артериальная гипертония и атеросклероз (АС) [3].

Перспективной на наш взгляд теорией атерогенеза является то, что первичным триггером атеросклеротического процесса может оказаться накопление и повышенное содержание цитокинов в периферической крови



на фоне изменений исходного уровня холестерина [1]. Имеется ряд исследований, в которых доказано, что и сами цитокины участвуют в процессах окисления липопротеинов [5].

Манифестирующие формы цереброваскулярной патологии связаны со значительными изменениями сосудистой стенки, не всегда сопровождающимися изменениями липидного состава крови, с чем нередко сталкиваются в клинике терапевты и неврологи. В большинстве случаев, поражения долгое время остаются бессимптомными, особенно в бассейнах внутренней сонной и позвоночной артерий [2]. Поэтому весьма актуальной задачей является поиск дополнительных биомаркеров донозологических и потенциально обратимых стадий АС.

**Цель работы:** изучение воспалительного ответа при хронических ЦВЗ путем определения концентрации ФНО- $\alpha$ , ИЛ-6, ИЛ-10, МСР-1, С-РБ в сыворотке крови.

**Материалы и методы.** Обследовано 60 пациентов (45 женщин и 15 мужчин в возрасте 45-65 лет, средний возраст составил  $58,3 \pm 1,8$  года) с хроническими ЦВЗ. Критерии исключения: клинические проявления АС других локализаций, имеющийся в анамнезе инсульт, а также инфекционные, онкологические и психические заболевания, сахарный диабет, прием статинов. Диагноз устанавливался на основе клинических данных, результатов ультразвукового исследования экстракраниальных артерий в режиме дуплексного сканирования с цветным доплеровским картированием потоков, магнитно-резонансной томографии головного мозга, лабораторных биохимических исследований по определению липидного спектра и состояло из определения уровня общего холестерина (ХС), ХС ЛПНП, ХС ЛПОНП стандартными методами с помощью наборов «Human». Количественный анализ ФНО- $\alpha$ , ИЛ-6, ИЛ-10, МСР-1, С-РБ в сыворотке крови обследуемых лиц проводили методом твердофазного иммуноферментного анализа с помощью наборов реагентов фирмы «Вектор-Бест». Контрольную группу составили 60 практически здоровых обследованных лиц, сопоставимых с опытной группой по полу (45 и 15 человек соответственно) и возрасту ( $57,9 \pm 1,6$  лет). Расчетным методом определялись уровни ХС ЛПВП, величина индекса атерогенности (ИА). Диагноз ДЭ устанавливался по классификации Е. В. Шмидта (1985). Статистическая об-

работка осуществлена с помощью программ MS Excel 2010 и Statistica 6.0.

**Результаты.** В результате статистического анализа полученных данных, были выявлены следующие особенности: содержание ХС, ЛПНП и ЛПОНП в сыворотке крови больных с хроническими ЦВЗ было достоверно выше ( $6,07 \pm 0,13$  ммоль/л;  $4,42 \pm 0,17$  ммоль/л), чем в группе контроля ( $4,34 \pm 0,24$  ммоль/л;  $2,65 \pm 0,21$  ммоль/л;  $p < 0,001$ ). ХС ЛПВП составил  $1,65 \pm 0,12$  ммоль/л в основной и  $1,69 \pm 0,13$  ммоль/л в контрольной группе ( $p > 0,05$ ). ИА –  $3,19 \pm 0,27$  и  $1,79 \pm 0,21$  соответственно ( $p < 0,001$ ).

В опытной группе статистически значимо были повышены концентрации ФНО- $\alpha$  ( $0,75 \pm 0,23$  пг/мл, при контрольном значении  $0,05 \pm 0,02$  пг/мл;  $p < 0,05$ ), С-РБ ( $7,10 \pm 0,83$  мг/мл, контроль –  $3,66 \pm 0,27$  мг/мл;  $p < 0,01$ ) и МСР-1 ( $225,81 \pm 10,98$  пг/мл и  $82,83 \pm 11,95$  пг/мл;  $p < 0,001$ ), что подтверждает наличие определенных составляющих системного воспалительного ответа, вероятно, способствующих повреждению сосудистой стенки и прогрессированию АС. Известна также роль ФНО- $\alpha$  в качестве стимулятора ангиогенеза и индуктора апоптоза. По нашему мнению, эти процессы могут иметь место при развитии воспалительного повреждения сосудистой стенки и объясняют установленную в ходе исследования активацию данного цитокина.

Вместе с тем концентрации интерлейкинов в исследуемых группах существенно не различались, и составили в опыте и контроле соответственно: ИЛ-6 –  $2,98 \pm 0,47$  пг/мл;  $2,11 \pm 0,54$  пг/мл ( $p > 0,05$ ), ИЛ-10 –  $2,49 \pm 0,61$  пг/мл;  $3,07 \pm 0,75$  пг/мл ( $p > 0,05$ ), что свидетельствует, скорее всего, об определенном балансе про- и противовоспалительных факторов на ранних стадиях атеросклероза.

**Выводы.** Результаты проведенных нами исследований подтверждают патогенетическую роль иммуновоспалительных процессов при церебральном АС. Целенаправленный скрининг у лиц с факторами риска АС маркеров повреждения сосудистой стенки, таких как ФНО- $\alpha$ , С-РБ, МСР-1, наряду с традиционным выявлением признаков дислипидемии, позволит своевременно начать необходимые лечебно-профилактические мероприятия на доклинических стадиях болезни, определяя тем самым контроль за развитием атеросклероза и улучшая прогноз ЦВЗ.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Залесский В. Н. Аутоиммунные и иммуновоспалительные процессы при атеросклерозе, его нутриентофилактика и терапия. Киев: Віпол, 2008 г. 592 с.
2. Липовецкий Б. М. Атеросклероз и его осложнения со стороны сердца, мозга и аорты. СПб.: СпецЛит, 2013 г. 58 с.
3. Манвелов Л. С., Кадыков А. С. // Лечащий Врач. 2000. № 7. С. 15-18.
4. Сафарова М. С., Сергиенко И. В., Ежов М. В. и др. // Атеросклероз и дислипидемии. 2014. № 3. С. 7-15.
5. Folcik V. A., Aamir R., Cathcart M. K. // Arterioscler. Thromb Vasc. Biol. – 1997. – Vol. 17. – P. 1954-1961.

DIAGNOSTIC VALUE MARKERS OF INFLAMMATION  
IN CHRONIC CEREBROVASKULAR DISEASES

Mavzyutova G. A., Lukmanova L. Z., Hakimova R. A.

*Bashkir State Medical University, Ufa, Russia*

This article presents an immunoinflammatory aspect of dyslipidemia, including characterization of TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10, MCP-1, C-RP in cerebral atherogenesis and shows the data of their own research.

*Keywords:* inflammatory markers of atherosclerosis, dyslipidemia, cytokines, chronic cerebrovascular disease.

СЫВОРОТОЧНЫЙ АЛЬВЕОМУЦИН, КАК ПОКАЗАТЕЛЬ  
АКТИВНОГО ВОСПАЛЕНИЯ У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКОЙ  
ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНЬЮ ЛЕГКИХМавзютова Г. А.<sup>1</sup>, Кузовкина О. З.<sup>2</sup>, Ибрагимова Л. А.<sup>1</sup>,  
Аминева Л. Х.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ГБОУ ВПО «Башкирский Государственный медицинский университет министерства здравоохранения Российской Федерации»; <sup>2</sup>ГБУЗ РБ ГKB № 5, Уфа, Россия

Было обследовано 36 больных с обострением ХОБЛ в возрасте от 35 до 70 лет (средний возраст – 55,7 ± 1,6). Определяли уровень альвеомуцина в сыворотке крови путем иммуноферментного анализа («ELISA») с помощью стандартных наборов («Хема», Россия). В день госпитализации в стационар средний уровень муцинового антигена в сыворотке крови у пациентов с ХОБЛ был максимальным, значительно отличаясь от показателя здоровых лиц ( $p < 0,01$ ) и достигал уровня 73,56 ± 8,35 ед/мл, статистически значимо ( $p < 0,05$ ) снижаясь до 40,93 ± 4,18 ед/мл к 10-му дню лечения. Были установлены корреляции между уровнем муцинового антигена и показателями общевоспалительного синдрома (лейкоцитозом, уровнем СОЭ и СРБ).

*Ключевые слова:* альвеомуцин, муциновый антиген ЗЕГ5, хроническая обструктивная болезнь легких.

Для лабораторной диагностики заболеваний дыхательной системы в последние десятилетия были предложены различные муцины (СА 15.3, СА 125, CASA). Полиморфные эпителиальные муцины представляют собой гликопротеины массой более 300 кДа, экспрессируемые на апикальной поверхности

клеток железистого эпителия. Альвеомуцин, или сывороточный муциновый антиген ЗЕГ5, был открыт австралийскими учеными при изучении интерстициальных болезней легких. Согласно исследованиям, при потере 1-го типа клеток в легочной ткани и восстановлении эпителиальной поверхности альвеолоци-

тами 2-го типа растет уровень исследуемого антигена в сыворотке крови пациентов [1, 3]. Проведенные нами ранее исследования показали, что сывороточный альвеомуцин, или муциновый антиген может быть дополнительным критерием степени тяжести и объема поражения легких при пневмонии и позволяет косвенно характеризовать этиологию заболевания [2]. Что касается использования данного маркера для характеристики хронических бронхолегочных процессов и их обострений, то идеальной моделью для таких исследований, на наш взгляд, является хроническая обструктивная болезнь легких – ХОБЛ.

**Материалы и методы исследования.** В настоящее время предложен метод определения уровня альвеомуцина в сыворотке крови путем иммуноферментного анализа («ELISA») с помощью стандартных наборов («Хема», Россия), который и был применен в данной работе. С целью изучения диагностического значения содержания сывороточного альвеомуцина было обследовано 36 больных с ХОБЛ в возрасте от 35 до 70 лет (средний возраст –  $55,7 \pm 1,6$ ), преимущественно мужчин (75%). Пациенты поступали в стационар в стадии обострения заболевания, в среднем на 4–7-й день заболевания.

**Результаты исследования.** Установлено, что в день обращения обследуемых в стационар средний уровень муцинового антигена в сыворотке крови у пациентов с ХОБЛ был максимальным, значительно отличаясь от показателя здоровых лиц ( $p < 0,01$ ) и достигал уровня  $73,56 \pm 8,35$  ед/мл, статистически значимо ( $p < 0,05$ ) снижаясь до  $40,93 \pm 4,18$  ед/мл к 10-му дню лечения.

По данным корреляционного анализа при сопоставлении уровня альвеомуцина с по-

казателями лейкоцитов у пациентов с ХОБЛ в день госпитализации выявлена сильная прямая ( $r_s = 0,68$ ,  $p < 0,0001$ ) взаимосвязь, ослабевающая в динамике ( $r_s = 0,42$ ,  $p < 0,05$ ). При изучении корреляций этого маркера с повышением СОЭ в день поступления установлена прямая умеренной силы связь ( $r_s = 0,73$ ,  $p < 0,0001$ ), также ослабевающая на 10-й день лечения ( $r_s = 0,2$ ,  $p < 0,5$ ). Однако наиболее сильная сопряженность проявилась между уровнем муцинового антигена и количественными показателями СРБ как в начале наблюдения ( $r_s = 0,79$ ,  $p < 0,0001$ ), так и в динамике заболевания ( $r_s = 0,78$ ,  $p < 0,0001$ ).

Корреляции, установленные между уровнем муцинового антигена и показателями общевоспалительного синдрома, указывают на возможное участие исследуемого маркера в иммунном ответе при инфекционных заболеваниях органов дыхания. При этом необходимо отметить специфичность этого показателя к поражению бронхолегочной системы в отличие от других острофазовых белков. Таким образом, показатель альвеомуцина является уникальным критерием, характеризующим одновременно два синдрома – общевоспалительный и поражения легочной ткани, поэтому его определение может с успехом применяться в диагностике заболеваний органов дыхания воспалительного характера и оценке степени тяжести процесса.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Авдеева О. Е., Лебедин Ю. С., Авдеев С. Н. и др. Пульмонология. – 1998. – № 2. – С. 22-27.
2. Караулов А. В., Мавзютова Г. А., Фазлыева Р. М. и др. Иммунокоррекция – Уфа, 2010. – 184 с.
3. Konho N., Awaya Y., Oyama T. et al. // Am. Rev. Respir. Dis. – 1993. – Vol. 148. – P. 637-642.

## MUCIN ANTIGEN AS COPD ACTIVE INFLAMATIONS INDICATOR

Mavzutova G. A.<sup>1</sup>, Kuzovkina O. Z.<sup>2</sup>, Ibragimova L. A.<sup>1</sup>,  
Amineva L. H.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Bashkir State Medical University; <sup>2</sup>Municipal clinic hospital № 5, Ufa, Russia

We examined 36 patients with acute exacerbation of COPD aged 35 to 70 years (mean age  $55,7 \pm 1,6$ ). We determined the level of mucin antigen in serum by enzyme-linked immunosorbent assay («ELISA») using standard tests («Hema», Russia). On the day of hospital admission, the average level mucin antigen in the serum of patients with COPD was the highest, significantly different from the rate of healthy persons ( $p < 0,01$ ) and reached the level of  $73,56 \pm 8,35$  u/ml, significantly ( $p < 0,05$ ) decreasing up to  $40,93 \pm 4,18$  u/ml to 10-th day of treatment. Were established correlation between the level mucin antigen and indicators observatory syndrome (leukocytosis, the level of ESR and CRP).

## ПРЯМОЕ ВЛИЯНИЕ ГРАНУЛОЦИТАРНОГО КОЛОНИЕ-СТИМУЛИРУЮЩЕГО ФАКТОРА НА Т-КЛЕТОЧНУЮ РЕАКТИВНОСТЬ

Малашенко В. В., Газатова Н. Д., Меняйло М. Е., Шмаров В. А.,  
Тодосенко Н. М., Мелашенко О. Б., Мельников А. Е., Исмаилова А. З.,  
Гончаров А. Г., Селедцов В. И.

ФГАОУ ВПО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта»,  
Калининград, Россия

Показано, что активация Т-лимфоцитов может индуцировать поверхностную экспрессию рецептора для гранулоцитарного колоние-стимулирующего фактора (granulocyte colony-stimulating factor receptor, G-CSFR). Сам CSF способен модулировать Т-клеточную экспрессию своего рецептора. G-CSF также обладает способностью снижать продукцию активированными Т-лимфоцитами интерлейкина-2 (interleukin-2, IL-2) и интерферона- $\gamma$  (interferon- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ ). Полученные данные указывают на непосредственную вовлеченность G-CSF в регуляцию адаптивных Т-клеточных реакций.

*Ключевые слова:* гранулоцитарный колоние-стимулирующий фактор, Т лимфоцит, интерлейкин-2, интерферон-гамма.

**Актуальность и цель работы.** Гранулоцитарный колоние-стимулирующий фактор (Granulocyte colony-stimulating factor, G-CSF) играет ключевую роль в поддержании гранулоцитопоэза и функциональной активности зрелых гранулоцитов [1]. Этот фактор также усиливает мобилизацию стволовых клеток из костного мозга в кровотока, оказывая тем самым позитивное влияние на регенеративные процессы [2].

В последнее время накапливаются данные об иммуномодулирующих свойствах G-CSF [3]. Хорошо изучено влияние G-CSF на моноциты и дендритные клетки, высоко экспрессирующие рецептор к G-CSF (G-CSFR) на своей поверхности. С другой стороны, прямое влияние G-CSF на лимфоидные клетки и, в частности, на Т-лимфоциты остается малоизученным [4].

**Цель настоящей работы** – оценить экспрессию G-CSFR на основных субпопуляциях Т-лимфоцитов и охарактеризовать влияние G-CSF на цитокин-продуцирующую функцию Т-клеток.

**Материалы и методы.** Мононуклеарные клетки (МНК) выделяли из периферической крови здоровых доноров (7 человек, средний возраст  $38,7 \pm 6,4$  лет) посредством градиент-

ного центрифугирования. CD3<sup>+</sup> Т-клетки получали из МНК методом позитивной колоничной магнитной сепарации с использованием магнитных частиц, конъюгированных с анти-CD3 антителами (Miltenyi Biotech, Германия). Чистота выделенных CD3<sup>+</sup>-лимфоцитов составляла не менее 98%. Далее CD3 клетки в концентрации  $1 \times 10^6$ /мл культивировали в бессывороточной среде TexMACS Medium (Miltenyi Biotech) с частицами, конъюгированными с антителами к CD2, CD3 и CD28 (T Cell Activation/Expansion Kit human, MACS Miltenyi Biotech), или без частиц в контроле в течение 48 ч. Перед культивированием в опытные пробы добавляли G-CSF (Miltenyi Biotech) в концентрациях 10, 1, 0,1, 0,01 нг/мл. После культивирования клетки окрашивали мечеными с помощью флюорохромов антителами к CD114, CD4, CD8, CD45RA и CD197 (eBioscience) и оценивали экспрессию поверхностных маркеров методом проточной цитометрии (BD Accuri<sup>®</sup>C6, BD Biosciences). Содержание интерферон-гамма (IFN- $\gamma$ ) и интерлейкина-2 (IL-2) определяли методом иммуноферментного анализа (ChemWell 2910, Awareness Technology, Inc.) с использованием коммерческих тест-систем («Вектор-Бест», Россия).

**Результаты и обсуждение.** Количество клеток экспрессирующих G-CSFR (CD114) среди неактивированных Т-лимфоцитов варьировало от 0,17% в CD8<sup>+</sup> терминально дифференцированных Т-лимфоцитах (CD8<sup>+</sup> TEMRA; CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD197<sup>-</sup>) до 1,83% в CD4<sup>+</sup> центральных Т-клетках памяти (CD4<sup>+</sup> CM; CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CD197<sup>+</sup>). Активация приводила к заметному увеличению количества CD114<sup>+</sup> Т-клеток. Процент активированных CD114<sup>+</sup> Т-клеток варьировал в диапазоне от 0,4% среди CD8<sup>+</sup> эффекторных Т-клеток памяти (CD8<sup>+</sup> EM CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CD197<sup>-</sup>) до 4,40% среди CD8<sup>+</sup> центральных Т-клеток памяти (CD8<sup>+</sup> CM CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CD197<sup>+</sup>). Интересно, что присутствие G-CSF в культуральной среде дополнительно повышало примерно на треть количество CD114<sup>+</sup> клеток среди активированных CD4<sup>+</sup>. И наоборот, под влиянием G-CSF происходило резкое снижение (с 4,40% до 1,23%) числа CD114<sup>+</sup> клеток среди активированных CD8<sup>+</sup> центральных Т-клеток памяти (CD8<sup>+</sup> CM CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CD197<sup>+</sup>CD114<sup>+</sup>). Присутствие в культуральной среде низких концентраций (0,01нг/мл) G-CSF приводило к сниже-

нию продукции активированными клетками как IL-2 (с 6996±504 до 4750±252 пг/мл), так и IFN-γ (с 8357,4±456,3 до 2292± 453 пг/мл). Однако этот эффект не наблюдался при более высоких концентрациях G-CSF. Таким образом активация Т-лимфоцитов может стимулировать экспрессию G-CSFR на их поверхности. Сам G-CSF может модулировать этот процесс. Снижение продукции IL-2 и IFN-γ активированными Т-клетками под воздействием G-CSF частично объясняет наличие у этого гемопоэтина противовоспалительных свойств. В целом, полученные данные свидетельствуют о вовлеченности G-CSF в непосредственную регуляцию адаптивных Т-клеточных реакций.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Черешнев В. А., Шмагель К. В. Иммунология: учебник, 4-е изд. Москва, 2014, с. 134.
2. Ярилин А. А. Иммунология: учебник. ГЭОТАР-Медиа, Москва 2010, 216-217.
3. Morikawa K., Morikawa S., Nakamura M., Miyawaki T. Br J Haematol 2002, 118, 296-304.
4. Nawa Y., Teshima T., Sunami K., Hiramatsu Y., Maeda Y., Yano T. et al. Bone Marrow Transplant 2000, 25, 1035-40.

### THE DIRECT INFLUENCE OF GRANULOCYTE COLONY-STIMULATING FACTOR ON THE T-CELL REACTIVITY

**Malashchenko V. V., Gazatova N. D., Meniailo M. E., Shmarov V. A.,  
Todosenko N. M., Melashchenko O. B., Melnikov A. E., Ismailova A. Z.,  
Goncharov A. G., Seledtsov V. I.**

*Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russia*

It is shown that activation of T-cells is able to induce surface expression of granulocyte colony stimulating factor receptor (G-CSFR). CSF, by itself, is capable of modulating the expression of its receptor on T-cells. G-CSF also possesses the ability to reduce production of interleukin-2 (IL-2) and interferon-γ (IFN-γ) by T-cells. These data indicate a direct role of G-CSF in adaptive regulation of T-cell responses.

## ИССЛЕДОВАНИЕ ЛОКАЛЬНОГО ЦИТОКИНОВОГО ПРОФИЛЯ ПРИ ОДОНТОГЕННЫХ ФЛЕГМОНАХ

Маркелова Е. В., Романчук А. Л., Красников В. Е.

ГБОУ ВПО Тихоокеанский государственный медицинский университет  
Минздрава России, Владивосток, Россия

Проведено исследование TNF $\alpha$ , TNF $\beta$ , IL-10, TGF $\beta$ <sub>1</sub> в ротовой жидкости у пациентов с одонтогенными флегмонами челюстно-лицевой области, которые были разделены на три группы в зависимости от распространенности воспалительного процесса. Оценка локального уровня цитокинов позволила выявить превалирование провоспалительных механизмов врожденного иммунитета и особенности иммунного ответа при различном клиническом течении воспаления в челюстно-лицевой области. У пациентов с гнойно-воспалительным процессом в одной анатомической области определено умеренное повышение TNF $\alpha$  и TGF $\beta$ <sub>1</sub>. При распространении процесса на несколько анатомических областей была зарегистрирована гиперпродукция, как провоспалительных (TNF $\alpha$ , TNF $\beta$ ), так и противовоспалительных (IL-10, TGF $\beta$ <sub>1</sub>) цитокинов. При распространенном процессе и сепсис-синдроме выявлено увеличение TNF $\beta$  и TGF $\beta$ <sub>1</sub>, тогда как уровень TNF $\alpha$  и IL-10 не отличался от референсных величин, что свидетельствует об активации Т-лимфоцитов, в том числе Т-регуляторных клеток и отражает супрессию макрофагального иммунитета.

*Ключевые слова:* цитокины, одонтогенные флегмоны.

**Актуальность и цель работы.** Проблема диагностики и лечения больных с гнойно-воспалительными заболеваниями челюстно-лицевой области остается актуальной. Несмотря на наличие доступной стоматологической и хирургической помощи населению и улучшение её качества, отмечается увеличение количества пациентов с так называемыми «молниеносными» формами течения заболевания, которые могут быть причиной серьезных, угрожающих жизни осложнений [1, 2]. Это связано с распространённостью хронической одонтогенной инфекции, снижением чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам и повышением их вирулентных свойств за счет широкой доступности антибиотиков и не всегда оправданного их применения [3]. На клиническую картину, течение и прогноз заболевания непосредственно влияют и изменения в иммунологической реактивности организма в целом, с тенденцией к нарушению иммунитета.

Перспективным направлением в профилактике осложнений гнойно-воспалительных заболеваний лица и шеи является исследование показателей местного врожденного и адаптивного иммунитета [4]. Исследования ротовой жидкости помогут определить наи-

более информативные маркеры воспаления, мониторировать склонность к распространению и определять тяжесть течения гнойно-септических заболеваний челюстно-лицевой области, что позволит совершенствовать существующие протоколы лечения.

**Целью** настоящей работы явилась оценка значимости изменений локального уровня цитокинов у пациентов с флегмонами челюстно-лицевой области в зависимости от распространенности процесса.

**Материалы и методы.** Проведен анализ историй болезни, а также наблюдение, обследование и лечение 58 больных (21 (36,2%) женщина и 37 (63,8%) мужчин) в возрасте 38,5 $\pm$ 3,7 года с одонтогенными флегмонами челюстно-лицевой области, находившихся на стационарном лечении в отделении челюстно-лицевой хирургии Краевой клинической больницы № 2 города Владивостока. Все пациенты поступили в клинику в экстренном порядке, получали лечение и обследование согласно существующим нормам. Диагнозы сформулированы на основании объективных методов исследования, интраоперационных данных в соответствии с международной классификацией болезней 10-го пересмотра. Пациенты были разделены на три группы в зависимости от распростра-

ненности воспалительного процесса. В первую группу (17 (29,3%) пациентов) включены больные с поражением одной анатомической области, вторая группа (26 (44,8%) человек) – пациенты с поражением нескольких анатомических областей, в третью группу (15 (25,9%) человек) включены пациенты с гнилостно-некротическими флегмонами дна полости рта – ангиной Людвига, сепсис-синдромом и медиастенитом. Контрольная группа – практически здоровые люди в количестве 20 человек в возрасте 20-50 ( $34,2 \pm 3,1$ ) лет.

С целью изучения активности воспалительного процесса и напряженности врожденного иммунитета проведено исследование про- и противовоспалительных цитокинов (TNF $\alpha$ , TNF $\beta$ , IL-10, TGF $\beta_1$ ) в ротовой жидкости методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием диагностических наборов R&D Diagnostics Inc. (USA). Статистическая обработка полученных результатов проведена на персональном компьютере в операционных системах Windows XP с использованием пакета прикладных программ «Statistica-6» и «Biostat» (непараметрическими методами). Для оценки различий между зависимыми и независимыми выборками применяли непараметрические критерии Вилкоксона–Манна–Уитни. Степень зависимости между различными параметрами оценивали с помощью критерия ранговой корреляции Спирмена.

**Результаты.** Результаты исследований локального цитокинового профиля. Так, уровень TNF $\alpha$  у пациентов с поражением одной анатомической области – 4,39 (3,60; 6,50)  $p_{1-2} < 0,05$ , у пациентов с поражением нескольких анатомических областей – 10,43 (3,50; 24,30)  $p_{2-3} < 0,05$ , у пациентов с гнилостно-некротическими флегмонами дна полости рта – 3,67 (3,50; 3,90)  $p_{1-3} < 0,05$ , у контрольной группы – 1,36 (0,50; 4,20). TNF $\beta$  у пациентов с поражением одной анатомической области – 7,15 (2,00; 8,50)  $p_{1-2} < 0,05$ , у пациентов с поражением нескольких анатомических областей – 10,43 (4,90; 11,80)  $p_{2-3} < 0,05$ , у пациентов с гнилостно-некротическими флегмонами дна полости рта – 15,00 (11,00; 53,40)  $p_{1-3} < 0,001$ , у контрольной группы – 4,32 (1,24; 5,46). Уровень IL-10 у пациентов с поражением одной анатомической области – 13,70 (6,20; 38,60)  $p_{1-2} < 0,05$ , у пациентов с поражением нескольких анатомических областей – 14,15 (6,20; 113,40)  $p_{2-3} < 0,05$ , у пациентов с гнилостно-некротическими флегмонами дна полости

рта – 6,20 (5,50; 42,70)  $p_{1-3} > 0,05$ , у контрольной группы – 8,69 (6,20; 24,60). TGF $\beta_1$  у пациентов с поражением одной анатомической области – 41,00 (20,00; 330,00)  $p_{1-2} > 0,05$ , у пациентов с поражением нескольких анатомических областей – 31,50 (80,00; 310,00)  $p_{2-3} < 0,05$ , у пациентов с гнилостно-некротическими флегмонами дна полости рта – 265,00 (153,00; 367,00)  $p_{1-3} < 0,05$ , у контрольной группы – 21,00 (10,60; 28,63).

У пациентов с флегмоной, ограниченной одной анатомической областью, выявлено умеренное увеличение TNF $\alpha$ . Его уровень в ротовой жидкости был статистически значимо выше, чем в контроле и у пациентов III группы ( $p < 0,05$ ). Значения TNF $\beta$  и IL-10 у пациентов этой группы не отличались от референсных величин, тогда как уровень TGF $\beta_1$  был повышен более чем в 2 раза. У пациентов II группы, с распространением воспалительного процесса на несколько анатомических областей, зарегистрировано повышение содержания как про- (TNF $\alpha$  и TNF $\beta$ ), так и противовоспалительных цитокинов (IL-10 и TGF $\beta_1$ ) в основном в 1,5–2 раза, только уровень TNF $\alpha$  у 68% пациентов этой группы был повышен более чем в 5 раз. У пациентов III группы выявлен повышенный уровень TNF $\beta$  в 2–3 раза по сравнению с контролем и обследованными больными других групп. У всех пациентов этой группы установлено существенное увеличение количества TGF $\beta_1$  в ротовой жидкости более чем в 5 раз по сравнению с референсными значениями и показателями других групп.

Для комплексной оценки локального цитокинового профиля были рассчитаны коэффициенты, отражающие превалирование, как про-, так и противовоспалительной активности цитокиновых механизмов. Выявлено, что его уровень статистически значимо выше у пациентов с распространенными флегмонами челюстно-лицевой области и у пациентов с гнилостно-некротическими флегмонами дна полости рта, медиастенитом и сепсис-синдромом. У обследованных III группы временно определена гиперпродукция TGF $\beta_1$ , свидетельствующая об активации T-регуляторных клеток. Это может быть одним из механизмов супрессии адаптивного иммунитета у этой категории больных.

Таким образом, оценка локального уровня цитокинов позволила выявить превалирование провоспалительных механизмов врожденного иммунитета при одонтогенных флег-

монах и особенности иммунного ответа при различном клиническом течении воспаления в челюстно-лицевой области. У пациентов с гнойно-воспалительным процессом в одной анатомической области определено умеренное повышение TNF $\alpha$  и TGF $\beta_1$ . При распространении процесса на несколько анатомических областей была зарегистрирована гиперпродукция, как провоспалительных (TNF $\alpha$ , TNF $\beta_1$ ), так и противовоспалительных (IL-10, TGF $\beta_1$ ) цитокинов. При распространенном процессе и сепсис-синдроме выявлено увеличение TNF $\beta$  и TGF $\beta_1$ , тогда как уровень TNF $\alpha$  и IL-10 не отличался от референсных величин, что

свидетельствует об активации Т-лимфоцитов, в том числе Т-регуляторных клеток и отражает супрессию макрофагального иммунитета.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Рамзанова А.Х., Мугадов И.М., Абакаров Р.Р. Бюллетень мед. интернет-конференций 2013, 3 (3), 743.
2. Diamantis S., Giannakopoulos N., Chou J., Foote J. Int J Surg Case Rep 2011, 2 (5), 65-67.
3. Недосейкина Т.В., Глухов А.А., Коротких Н.Г. Фундаментальные исследования 2004, 4-3, 641-646.
4. Карзакова Л.М., Сидоров И.А. Иммунология 2013, 34 (3), 155-158.

### DETERMINATION OF ODONTOGENIC PHLEGMON LOCAL CYTOKINE PROFILE

Markelova E. V., Romanchuk A. L., Krasnikov E. V.

*Pacific State Medical University of MH of the Russian Federation, Vladivostok, Russia*

TNF $\alpha$ , TNF $\beta$ , IL-10, TGF $\beta_1$  determination was made in oral fluids from patients with maxillofacial odontogenic phlegmons, which were divided into 3 groups depending on the prevalence of inflammation. Local cytokine level score permitted to define a preponderance of pro-inflammatory mode of inborn immunity and also the immune response under maxillofacial inflammations. Patients that had pyoanflammation in one anatomic area demonstrated modest increase in TNF $\alpha$  and TGF $\beta_1$ . Patients that had pyoinflammation in several areas showed an increase in proinflammatory cytokines (TNF $\alpha$ , TNF $\beta_1$ ) and also exhibited an increase in anti-inflammatory cytokines (IL-10, TGF $\beta_1$ ). Patients that had generalized process and sepsis syndrome showed an increase in TNF $\beta$  and TGF $\beta_1$ , but the level of TNF $\alpha$  and IL-10 did not stand out of the reference range, and this is an indication of T-cell activation, including Tregs and also suppression of macrophage immunity.

### ПРОДУКЦИЯ ЦИТОКИНОВ КЛЕТКАМИ ГОЛОВНОГО МОЗГА ЖИВОТНЫХ С ПАССИВНЫМ ТИПОМ ПОВЕДЕНИЯ ПОСЛЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ МОДУЛИРОВАННЫХ КОФЕИНОМ ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫХ КЛЕТОК

Маркова Е. В., Княжева М. А.

*ФГБНУ «НИИ фундаментальной и клинической иммунологии», Новосибирск, Россия*

Взаимодействие основных адаптационных систем организма подразумевает регулирующее влияние со стороны иммунной системы, ее клеточных элементов и цитокинов на функции центральной нервной системы. В настоящем исследовании продемонстрировано, что обработка *in vitro* кофеином спленоцитов мышей с пассивным типом поведения изменяет функциональную активность указанных клеток; трансплантация этих клеток сопровождается модуляцией продукции цитокинов в головном мозге, регистрируемой на фоне стимуляции поведения сингенных реципиентов. Обсуждаются возможные механизмы участия цитокинов в изменении поведения реципиентов после трансплантации модулированных кофеином иммунокомпетентных клеток.

*Ключевые слова:* иммунокомпетентные клетки, кофеин, головной мозг, цитокины, поведение.



Нами изучается афферентное звено нейроиммунных взаимодействий, механизмы ответа мозга на активацию иммунной системы, участие иммуногенных факторов и клеточных элементов иммунной системы в регуляции его физиологических функций, в частности, поведенческих реакций. Актуальность исследования роли клеточных элементов иммунной системы и их цитокинов в регуляции поведенческих реакций, определяется как наличием широкого спектра неврозоподобных, аффективно-личностных, когнитивных и поведенческих нарушений, возникающих при вторичных иммунодефицитах вследствие повторных и хронически действующих экологических и социальных стрессоров, так и довольно активным проведением в настоящее время иммунотерапевтических мероприятий, в том числе и с использованием клеточных технологий, при различной патологии. Пассивное поведение ведет к снижению сопротивляемости организма, являясь тем самым неспецифической и универсальной предпосылкой к развитию самых разнообразных форм патологии и, следовательно, подлежит коррекции. Ранее нами была продемонстрирована способность иммунокомпетентных клеток с определенными функциональными характеристиками направленно изменять параметры поведения экспериментальных животных в «открытом поле» [2, 3].

**Целью** настоящего исследования было изучение влияния трансплантации иммунокомпетентных клеток, функциональная активность которых была изменена экстракорпоральной обработкой психостимулятором, на продукцию цитокинов в головном мозге животных-реципиентов с пассивным типом поведения.

**Методика исследования.** Работа выполнена на мышах-самцах (СВАхС57Bl/6)F1 в возрасте трех месяцев; средний вес животных составлял 18-20 грамм, Животных содержали в условиях лабораторного вивария в клетках по 10 особей в каждой, не менее 2-х недель до начала эксперимента на стандартной диете, при свободном доступе к воде и нормальном световом режиме.

Ориентировочно-исследовательское поведение животных до и после клеточной трансплантации оценивали в тесте «открытое поле», как это было описано ранее [2, 3]. В экспериментах в качестве доноров и реципиентов использовались животные, характеризующиеся пассивным типом поведения в «открытом поле».

Выделение иммунокомпетентных клеток селезенки производилось по описанной ранее методике [2, 3]. Далее клетки селезенки обрабатывали *in vitro* кофеином из расчета  $15 \times 10^6$  клеток / 100 мкг кофеина в присутствии 3% FCS (Hyclone) в течение 25 минут. Затем, после 3-кратного отмывания, прекультивированные с кофеином спленоциты внутривенно вводили сингенным мышам-реципиентам в концентрации  $15 \times 10^6$  клеток в объеме 0,3 мл физиологического раствора на одно животное. В контрольной группе животных подготовка и трансплантация спленоцитов проводилась в аналогичных условиях эксперимента, за исключением того, что последние культивировались без присутствия кофеина.

Количественное содержание цитокинов определяли в образцах культуральных супернатантов трансплантируемых клеток, а также в лизатах головного мозга животных – реципиентов методом ИФА (ELISA) с использованием специфических компонентов к цитокинам мыши производства фирмы «R&D Systems» (Великобритания). Принцип анализа «sandwich» – вариант твердофазного трехстадийного иммуноферментного анализа на планшетах (моноклональные антитела на подложке, конъюгат поликлональных антител с биотином).

Статистическая обработка результатов производилась с применением парного критерия Манна-Уитни (компьютерная программа «Statistica 6.0»). Результаты представлены в виде  $M \pm SD$ . Различия считали достоверными при  $p < 0,05$ .

**Результаты и обсуждение.** Ранее нами было показано, что трансплантация спленоцитов, обработанных кофеином, сопровождалась неоднозначными изменениями параметров ориентировочно-исследовательского поведения мышей – реципиентов, характер которых определялся используемой концентрацией препарата. Стимуляция моторного и исследовательского компонентов указанного поведения регистрировалась после трансплантации клеток, прекультивированных кофеином в низких концентрациях (10 мкг, 100 мкг / на мышь); при трансплантации спленоцитов, обработанных кофеином в концентрации 500 мкг / на мышь наблюдалась достоверная стимуляция только моторного компонента поведения за счет повышения показателей периферической горизонтальной двигательной активности; трансплантация спленоцитов, обработанных кофеином

в концентрации 1000 мкг/на мышь и выше вызывала у реципиентов дезорганизацию поведения [1, 5]. Учитывая полученные результаты, в настоящем исследовании, для обработки трансплантируемых клеток использовалась оптимальная концентрация кофеина, стимулирующая все параметры поведения пассивных реципиентов в «открытом поле», которая составляла 100 мкг/на мышь.

Оценка функциональной активности спленоцитов, выделенных у мышей с пассивным типом поведения и обработанных *in vitro* кофеином в указанной концентрации, выявила модуляцию продукции клетками цитокинов. Так, наблюдалось достоверное повышение спонтанной ( $6,77 \pm 0,4$  пг/мл и  $11,91 \pm 1,3$  пг/мл;  $p < 0,05$ ) и стимулированной ЛПС продукции ФНО $\alpha$  ( $10,28 \pm 3,0$  пг/мл и  $17,14 \pm 4,8$  пг/мл в культуральных супернатантах спленоцитов контрольной и опытной группы соответственно;  $p < 0,05$ ); а также ИЛ-6 ( $2,08 \pm 0,3$  пг/мл и  $4,90 \pm 2,5$  пг/мл в супернатантах спленоцитов контрольной и опытной группы соответственно;  $p < 0,05$ ). При трансплантации модулированных кофеином клеток селезенки реципиентам с пассивным типом поведения у последних, наряду с повышением параметров ориентировочно-исследовательского поведения, регистрировались определенные изменения продукции ряда провоспалительных цитокинов клетками головного мозга. Так, выявлено снижение содержания в головном мозге ФНО $\alpha$  ( $792,6 \pm 22,3$  пг/мл и  $530,6 \pm 13,3$  пг/мл в контрольной и опытной группе соответственно;  $p < 0,05$ ), ИЛ-1 $\beta$  ( $705,8 \pm 55,5$  пг/мл и  $591,5 \pm 73,0$  пг/мл в контрольной и опытной группе соответственно;  $p < 0,05$ ) и ИНФ $\gamma$  ( $425,5 \pm 65,3$  пг/мл и  $307,6 \pm 65,2$  пг/мл в контрольной и опытной группе соответственно;  $p < 0,05$ ).

Цитокины обладают многообразными регуляторными функциями, являясь как иммунорегуляторами, так и нейромодуляторами, вовлекаясь во множество физиологических процессов в центральной нервной системе. Известно, что циркулирующие цитокины способны проникать через гематоэнцефалический барьер и модулировать когнитивные функции, воздействуя на нейроны, нейрональное проведение сигнала и активность нейромедиаторных систем головного мозга [4]. Ранее нами было показано, что трансплантация спленоцитов с высокой продукцией ИЛ-6 сопровождается у сингенных мышей-реципиентов стимуляци-

ей исследовательского компонента поведения посредством усиления экспрессии гена рецептора эритропоэтина в головном мозге [2, 3]. Полученный эффект может быть также следствием стимулирующего влияния указанного цитокина на активность дофаминергической системы головного мозга, равно как и его способности индуцировать в мозге синтез антагонистов рецептора ИЛ-1 и растворимого рецептора ФНО – p55 [4]. Последнее может также нивелировать супрессирующий эффект на поведение реципиентов ФНО $\alpha$ , продуцируемого трансплантируемыми клетками. Выявленное в настоящем исследовании снижение в головном мозге реципиентов содержания ряда провоспалительных цитокинов, оказывающих депрессивные эффекты на поведенческие реакции [2, 3, 4], является одним из механизмов модуляции параметров поведения животных после трансплантации спленоцитов, обработанных *in vitro* кофеином.

Таким образом, в настоящем исследовании, продемонстрировано, что стимулирующий поведение реципиентов эффект трансплантации спленоцитов, обработанных кофеином, сопровождается снижением содержания ряда провоспалительных цитокинов в головном мозге. Можно полагать, что в качестве триггерных факторов, приводящих к изменениям функциональной активности ЦНС у реципиентов при этом выступают цитокины, продуцируемые трансплантируемыми клетками. По всей видимости, головной мозг реагирует на изменение цитокинового профиля на периферии, отвечая на этот стимул модуляцией собственного синтеза цитокинов и активности нейромедиаторных систем, следствием чего и являются изменения параметров поведения животных-реципиентов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Княжева М. А., Маркова Е. В. Вестник Уральской медицинской академической науки, 2011. – № 2–1 (35). – С. 36–37.
2. Маркова Е. В. Механизмы нейроиммунных взаимодействий в реализации поведенческих реакций. Красноярск. – 2012. – 236 с.
3. Маркова Е. В., Абрамов В. В., Козлов В. А. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 2009. – Т. 147. – № 4. – С. 435–441.
4. Ader Robert. Psychoneuroimmunology. University of Chicago Press. – 2007. – V.1. – 1269 p.
5. Markova E. V., Knyazeva M. A., Kozlov V. A. International Journal of Advanced Studies, 2014. – P. 17–22.

## BRAIN CYTOKINES PRODUCTION IN ANIMALS WITH PASSIVE BEHAVIOR AFTER TRANSPLANTATION OF CAFFEINE MODULATED IMMUNE CELLS

Markova E. V., Knyazheva M. A.

*Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russia*

Interaction of the main adaptive systems of the body implies immune system, its cellular elements and cytokines participation in the regulation of the central nervous system functions. In the present study we demonstrated that immune cells of mice with passive behavior change their functional activity after *in vitro* treatment with caffeine. Transplantation of these cells leads to decrease in the number of brain proinflammatory cytokines, which accompanied the stimulation of recipient's behavior. Possible mechanisms of the cytokines involvement in the stimulation of recipient's behavior after the transplantation of caffeine modulated immune cells are discussed.

*Key words:* immune cells, caffeine, brain, cytokines, behavior.

---

---

## РОЛЬ ИНТЕРЛЕЙКИНА-8 В РЕГУЛЯЦИИ АДАПТИВНЫХ Т-КЛЕТОЧНЫХ РЕАКЦИЙ

Меняйло М. Е., Малащенко В. В., Шмаров В. А., Газатова Н. Д.,  
Тодосенко Н. М., Мельников А. Е., Мелашенко О. Б., Исмаилова А. З.,  
Гончаров А. Г., Селедцов В. И.

*ФГАОУ ВПО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта»,  
Калининград, Россия*

Показано, что активация Т-клеток памяти приводит к индукции на их поверхности экспрессии рецептора интерлейкина-8 (CXCR1). Под воздействием интерлейкина-8 (interleukin-8, IL-8) активированные Т-лимфоциты продуцировали существенно меньше IL-2, но при этом вырабатывали больше интерферона- $\gamma$  (interferon- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ ). Полученные данные указывают на вовлеченность IL-8 в регуляцию адаптивных Т-клеточных реакций.

*Ключевые слова:* интерлейкин-8, Т-лимфоцит, CXCR1, интерлейкин-2, интерферон- $\gamma$ .

**Актуальность и цель работы.** IL-8 является хемокином, стимулирующим приток нейтрофилов, макрофагов, эозинофилов и лимфоцитов в очаг воспаления [1]. Основными продуцентами IL-8 являются моноциты, макрофаги и эндотелиальные клетки. Клеточная продукция IL-8 возрастает под воздействием небелковых медиаторов воспаления и провоспалительных цитокинов [2, 3]. Биологические эффекты IL-8 развиваются в результате связывания IL-8 с мембранными рецепторами CXCR1 и CXCR2. CXCR1 является высокоаффинным рецептором, он взаимодействует только с IL-8. CXCR2, в отличие от CXCR1, может связывать и другие альфа-хемокины.

Считается, что нейтрофилы являются главной мишенью для IL-8 [4]. С другой стороны, Т-лимфоциты являются дирижерами воспалительных реакций. Поэтому, роль IL-8 в регуляции адаптивных Т-клеточных реакций представляет несомненный интерес.

**Цель работы** – оценить экспрессию CXCR1 (CD181) на Т-лимфоцитах человека и охарактеризовать прямое влияние IL-8 на Т-клеточную продукцию интерлейкина-2 (IL-2) и интерферона-гамма (IFN- $\gamma$ ).

**Материалы и методы.** Мононуклеарные клетки (МНК) были получены от 4 условно здоровых доноров (средний возраст составил  $30,5 \pm 2,3$  года) посредством градиентного цен-

трифугирования крови. CD3<sup>+</sup> Т-лимфоциты выделяли из МНК методом позитивной магнитной сепарации с использованием меченых биотином анти-CD3 антител (Anti-Human CD3 Biotin, eBioscience) и связанных со стрептавидином магнитных частиц, согласно протоколу компании производителя (BD IMag™ Streptavidin Particles Plus-DM, BD Biosciences). Чистота выделенных CD3<sup>+</sup> лимфоцитов составляла не менее 98%. Полученные Т-лимфоциты культивировали в бессывороточной среде (TechMACS, Miltenyi Biotech) с частицами, конъюгированными с антителами к CD2, CD3 и CD28 (T Cell Activation/Expansion Kit human, MACS, Miltenyi Biotech, Германия) и без них в контроле в течение 48 ч. IL-8 (Miltenyi Biotech) был добавлен в часть проб в трех концентрациях (10 нг/мл, 1 нг/мл, 0.1 нг/мл). Мембранную экспрессию поверхностных маркеров (CD181, CD197, CD45RA, CD4, CD8) оценивали на проточном цитофлуориметре (BD Accuri<sup>®</sup>C6 Flow Cytometer, BD Biosciences) с использованием соответствующих, конъюгированных с флуорохромом антител (eBioscience). Экспрессию CXCR1 определяли на наивных Т-клетках, Т-клетках памяти и терминально дифференцированных Т-лимфоцитах. Уровни IL-2 и IFN-γ в Т-клеточных супернатантах определяли иммуноферментным методом на автоматическом анализаторе (Chem Well) с использованием соответствующих коммерческих тест-систем (ЗАО «ВЕКТОР-БЕСТ»).

**Результаты.** Экспрессия CXCR1 была выявлена как на 2,35±0,17% CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитах, так и на 3,6±2,4% CD8<sup>+</sup> лимфоцитах, прокультивированных без активатора. Активация Т-лимфоцитов индуцировала экспрессию CXCR1 на Т-клетках памяти (10,55±3,01%), не оказывая существенного влияния на экспрессию этого рецептора среди наивных (1,2±0,56%) и терминально дифференцированных (2,2±0,02%) Т-клеток.

Продукция IL-2 и IFN-γ активированными Т-клетками составила 6492±94,5 пг/мл и 1291,5±84 пг/мл, соответственно. IL-8 снижал продукцию IL-2 до диапазона от 4524±121,5 пг/мл до 4755±73,5 пг/мл, но одновременно увеличивал выработку IFN-γ до диапазона от 3898,5±109,5 пг/мл до 4014±54 пг/мл.

Полученные данные указывают на то, что экспрессия рецептора IL-8 на Т-лимфоцитах может иметь индуцибельный характер. Снижая продукцию IL-2, IL-8 мог бы сдерживать пролиферацию Т-клеток памяти, тогда как за счет усиления продукции IFN-γ, он мог бы способствовать функциональной активации Т-хелперов 1 типа и макрофагов в условиях воспаления.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Murphy P.M., Tiffany H.L. Science 1991, 253, 1280.
2. Черешнев В.А., Шмагель К.В. Иммунология. Москва 2014.
3. Ярилин А.А. Иммунология. ГЭОТАР-Медиа, Москва 2010.
4. Bickel M. J Periodontol 1993, 64, 456-60.

### ROLE OF INTERLEUKIN-8 IN REGULATION OF ADAPTIVE T-CELL RESPONSES

**Meniailo M. E., Malashchenko V. V., Shmarov V. A., Gazatova N. D., Tudosenko N. M., Melnikov A. E., Melashchenko O. B., Ismailova A. Z., Goncharov A. G., Seledtsov V. I.**

*Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russia*

Activation of memory T-cells has been found to result in the induction of expressing interleukin-8 receptor (CXCR1) on their surface. Upon action of interleukin-8 (interleukin-8, IL-8), activated T cells produced significantly less IL-2, but elaborated more IFN-g (interferon-γ, IFN-γ). These data indicate the involvement of IL-8 in regulating the adaptive T cell responses.

## НАРУШЕНИЕ СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СВОЙСТВ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ КАК ФАКТОР РИСКА РАЗВИТИЯ ЭКССУДАТИВНОГО СРЕДНЕГО ОТИТА У ДЕТЕЙ С ХРОНИЧЕСКИМ АДЕНОИДИТОМ

Плешко Р. И.<sup>1,2</sup>, Кологривова Е. Н.<sup>1,2</sup>, Щербик Н. В.<sup>1,2</sup>,  
Староха А. В.<sup>1,2</sup>, Акбашева О. Е.<sup>1</sup>, Шевцова Н. М.<sup>1</sup>,  
Аргунова Н. А.<sup>1</sup>, Ситникова А. В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Сибирский государственный медицинский университет; <sup>2</sup>Томский филиал ФГБУ «Научно-клинический центр оториноларингологии ФМБА», Томск, Россия

Изучены содержание миелопероксидазы, катионных белков, кислой и щелочной фосфатазы в нейтрофилах (Нф) крови, число Нф в мазках-отпечатках со слизистой носа, активность эластазы и концентрация IL-8 в назальных смывах у детей с хроническим аденоидитом, осложненным экссудативным средним отитом. Выявлено значительное снижение содержания миелопероксидазы в Нф крови, уменьшение числа Нф на слизистой носа и концентрации IL-8 в назальных смывах, что может приводить к нарушению микробицидности слизистой оболочки и распространению воспаления.

*Ключевые слова:* нейтрофилы, микробицидность, хемокины, аденоидит, отит.

Воспалительные заболевания лимфоэпителиального глоточного кольца широко распространены среди детского населения (20–50%), что связано с функциональной незрелостью слизистых барьеров и иммунитета в целом. Как правило, первым звеном в цепи повреждений становятся аденоиды, воспаление в которых нередко приобретает хронический характер и может приводить к серьезным осложнениям, одним из которых является экссудативный средний отит (ЭСО) [1]. Эффективность защитных реакций на слизистых покровах у детей во многом определяется состоянием врожденного иммунитета, важной частью которого являются компоненты фагоцитарного звена [2].

Целью исследования стало изучение структурно-функциональных особенностей нейтрофильных (Нф) гранулоцитов у детей с хроническим аденоидитом (ХА), ассоциированным с ЭСО.

Исследованы мазки периферической крови, мазки-отпечатки со слизистой носа, назальные смывы 87 детей в возрасте от 3 до 7 лет (38 детей с ХА и 33 – с ХА, осложненным ЭСО, в состоянии ремиссии и 16 практически здоровых детей) без отягощенного аллерго-

логического анамнеза. Изучалось: число Нф в гемограмме и риноцитогамме (%); содержание миелопероксидазы, катионных белков, кислой фосфатазы и щелочной фосфатазы в Нф крови (с определением среднего цитохимического коэффициента); концентрация интерлейкина (IL)-8 (иммуноферментным методом) и активность эластазоподобных протеиназ в назальных смывах. Критический уровень значимости различий принимался, равным 0,05.

Анализ показал, что число Нф в лейкограмме крови у больных детей в среднем не отличалось от значений здоровых. Не получено каких-либо различий и в насыщенности гранулоцитов катионными белками, кислой и щелочной фосфатазой. Однако, цитохимическая оценка миелопероксидазы показала, что в Нф детей, больных ХА, ассоциированным с ЭСО, ее содержание было существенно снижено (2,23 (1,93–2,84)) как по отношению контрольных значений (2,78 (2,42–2,96),  $p=0,006$ ), так и показателей пациентов с не осложненным ХА (2,74 (2,34–2,89),  $p=0,02$ ).

Изучение назальных смывов продемонстрировало нарушение миграции Нф на слизистые оболочки у всех больных детей, что

проявилось в уменьшении их числа в риноцитограмме до 12 (3–21)% при не осложненном ХА ( $p=0,01$ ) и 7 (3–26)% при ХА, ассоциированным с ЭСО (62 (40–83)% – у практически здоровых детей,  $p=0,001$ ). Это сочеталось с выраженным уменьшением в назальных смывах IL-8, концентрация которого снижалась у детей с не осложненным ХА до 345 (158–418) мг/г-белка (416 (379–501) мг/г-белка – в контроле;  $p=0,001$ ) и приобретала минимальные значения у пациентов с ЭСО (190 (130–269) мг/г-белка,  $p=0,001$ ). Известно, что IL-8 является главным хемокином для Нф, и низкая его концентрация на слизистой носа может свидетельствовать о нарушении процессов трансэпителиальной миграции лейкоцитов.

Биохимические исследования не выявили статистически значимых различий в показателях средней активности эластазы в назальных смывах у больных и здоровых детей. В связи с этим были проанализированы индивидуальные значения активности эластазы, позволившие разделить каждую клиническую группу на 3 подгруппы: с высокими показателями активности фермента (0,55–1,11 мкмоль БАНЭ/млхмин), со сниженными значениями активности (0,15–0,25 мкмоль БАНЭ/млхмин) и с параметрами, характерными для практически здоровых детей (0,38–0,48 мкмоль БАНЭ/млхмин). Оказалось, что среди больных ХА преобладали лица с пониженной протеолитической активностью (50%), у 17% детей активность фермента была повышена, а у 33% находилась в пределах нормы. В то же время у 50% детей с осложненным ХА чаще наблюдалась повышенная, по сравнению с референтными значениями, активность эластазы ( $p=0,001$ ) и только у 29% детей активность фермента была снижена ( $p=0,018$ ).

Известно, что даже у практически здоровых лиц в условиях респираторной нагрузки отмечается приток нейтрофилов с хорошей погложительной активностью, появляются эозинофилы и макрофаги. Микробицидная функция Нф зависит от количества и активности внутриклеточных ферментов. Миелопероксидаза относится к ключевым антимикробным ферментам, т.к. продуктами катализируемых реакций являются сильные окислители (в частности, гипохлорит), реактивные производные азота

и свободные радикалы. Биосинтез миелопероксидазы начинается в миелоцитах костного мозга и продолжается в ходе их дифференцировки до выхода зрелых гранулоцитов в кровеносное русло. Выявленное нами существенное уменьшение этого фермента в Нф крови может свидетельствовать о наличии неких дефектов в системе гранулоцитопоэза (врожденных или приобретенных) у детей с осложненной формой ХА. Вероятно, возникающее при этом снижение антимикробного потенциала микрофагоцитов могло стать основой для хронизации воспалительного процесса в аденоидах и его распространения в полость среднего уха.

Одним из патогенетических аспектов пролонгации воспаления и вовлечения близлежащих регионов могла быть усиленная активность другого фермента – эластазы, секретируемой в зоне воспаления нейтрофилами и способной к гидролизу эластиновых волокон соединительной ткани, протеогликанов, коллагена. Гисто- и цитолитические процессы, инициируемые действием этого фермента, безусловно, могли стать важным условием формирования ЭСО у детей с хроническим аденоидитом.

Нарушение барьерных функций верхних дыхательных путей у детей с ЭСО может быть связано и с выявленным нами уменьшением числа Нф в назальных смывах. Исследования последних лет говорят о важном значении трансэпителиальной элиминации фагоцитов для успешного разрешения воспаления на слизистых покровах [3]. Снижение числа Нф на поверхности носоглотки может быть опосредовано, в том числе, нарушением продукции IL-8, являющегося главным хемоаттрактантом для этих гранулоцитов.

Таким образом, при осложненном течении ХА снижена микробицидная способность Нф и угнетена их эмиграция на слизистые оболочки носоглотки.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дроздова М. В. / Российская оториноларингология. – 2011. – № 4 (53). – С. 62-68.
2. Тотолян А. А. / Клетки иммунной системы. – СПб.: Наука, 2001. – 390 с.
3. Persson C., Uller L. / British Journal of Pharmacology. – 2012. – 165. – P. 2100-2109.

## THE DISORDER OF NEUTROPHILS STRUCTURAL AND FUNCTIONAL PROPERTIES AS A RISK FACTOR OF THE DEVELOPMENT OTITIS MEDIA WITH EFFUSION IN CHILDREN WITH ADENOIDITIS

Pleshko R. I.<sup>1,2</sup>, Kologrivova E. N.<sup>1,2</sup>, Sherbik N. V.<sup>1,2</sup>, Starocha A. V.<sup>1,2</sup>, Akbasheva O. E.<sup>1</sup>, Shevtcova N. M.<sup>1</sup>, Argunova N. A.<sup>1</sup>, Sitnicova A. V.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Siberian state medical university, Tomsk, Russia; <sup>2</sup>Tomsk branch "Scientific Clinical Center of Otorhinolaryngology of FMBA", Tomsk, Russia

The contents of myeloperoxidase, cationic proteins, acid and alkaline phosphatases in neutrophils in the blood, the number of neutrophils in the impression smears from the nasal mucosa, activity of elastase and concentration of IL-8 in nasal washes was investigated in children with chronic adenoiditis and otitis media with effusion. There was a significant decrease in the content of myeloperoxidase in blood neutrophils, decrease of the number of neutrophils in the nasal mucosa and concentration of IL-8 in nasal washes, which may lead to the disturbance of the microbicidal activity of the mucosa and promote the extension of the inflammation.

---

---

## ИССЛЕДОВАНИЕ ДИНАМИКИ УРОВНЯ ЦИТОКИНОВ И МАТРИКСНЫХ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ 1 И 8 ТИПОВ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ПОСТТРАВМАТИЧЕСКОМ ОСТЕОМИЕЛИТЕ НИЖНЕЙ ЧЕЛЮСТИ

Попова Е. В., Красников В. Е., Ивасик А. С.

ГБОУ ВПО «Тихоокеанский государственный медицинский университет»  
Минздрава России, Владивосток, Россия

Обострение хронического посттравматического остеомиелита нижней челюсти определяется выраженным повышением концентрации провоспалительного цитокина в 1-е и 10–12е сутки, а противовоспалительного – только в первые сутки, что свидетельствует о нарушении функционирования как цитокиновой сети организма, так и иммунной системы в целом. Достоверно высокие показатели матриксных металлопротеиназ-1 и 8 ведут к деградации коллагеновых нитей в процессе ремоделирования экстрацеллюлярного матрикса, вследствие чего происходит прогрессирование деструктивных процессов в костной ткани.

*Ключевые слова:* хронический остеомиелит, цитокины, матриксные металлопротеиназы.

В структуре общей заболеваемости челюстно-лицевой области, травмы занимают одно из первых мест и составляют по данным различных авторов от 40% до 60% [1]. Из числа осложнений воспалительного характера наиболее частым, является посттравматический остеомиелит, который приводит к длительной нетрудоспособности, а иногда к инвалидизации [4].

Особое влияние на развитие деструктивного процесса в костях челюстей преимущественно связано с бактериальной фло-

рой ротовой полости и активацией системы врожденного иммунитета, в частности, провоспалительными цитокинами. Цитокины запускают комплекс местных защитных реакций, вовлекают все типы клеток-эффекторов в элиминацию патогенна и восстановление целостности тканей [2].

Одним из механизмов цитокиновой регуляции является индукция продукции матриксных металлопротеиназ и их тканевых ингибиторов [2]. Матриксная металлопротеиназа-1 (ММП-1) и матриксная металлопротеиназа-8

(ММП-8) принимают участие в деградации коллагеновых нитей в процессе ремоделирования экстрацеллюлярного матрикса, вследствие чего происходят деструктивные процессы в костной ткани. Активность ММП-1 строго контролируется тканевым ингибитором металлопротеиназы-1 типа (ТИМП-1), которые могут блокировать разрушение экстрацеллюлярного матрикса. Одно из основных мест экспрессии ТИМП-1 является костная ткань. На сегодняшний день не найдено данных о комплексном изучении уровня ММП-1, ММП-8 и ТИМП-1 у пациентов с хроническим посттравматическим остеомиелитом нижней челюсти.

**Цель исследования:** определение содержания уровня ФНО- $\alpha$ , ИЛ-4, ММП-1, ММП-8, ТИМП-1, ММП-1/ТИМП-1 в сыворотке крови у больных с хроническим посттравматическим остеомиелитом нижней челюсти в стадии обострения.

**Материалы и методы исследования.** Объектом исследования стали 15 пациентов, находившиеся на стационарном лечении в отделении челюстно – лицевой хирургии ГБУЗ «Краевая клиническая больница № 2» г. Владивостока. В исследуемую группу вошли 12 мужчин, 3 женщины (средний возраст 39 [28;51] лет) с диагнозом хронический посттравматический остеомиелит нижней челюсти в стадии обострения. В группу контроля вошли 10 клинически здоровых добровольцев, сопоставимые по полу и возрасту с пациентами. Производился двукратный забор венозной крови (8-10 мл) в 1-е сутки госпитализации в стационар и на 10–12-е сутки лечения. Статистическая обработка материала проводилась методами параметрической описательной статистики с использованием *t*-критерия Стьюдента с помощью компьютерной программы «Biostat». Статистически достоверным считали различия при уровне значимости  $p < 0,05$ .

**Результаты исследования.** У пациентов с хроническим посттравматическим остеомиелитом нижней челюсти в стадии обострения зарегистрированы достоверно высокие показатели ФНО- $\alpha$  в 1-е ( $22,21 \pm 3,25$  пг/мл), 10-12-е сутки ( $16,03 \pm 0,74$  пг/мл), что в 8-10 раз выше по сравнению с контрольной группой ( $2,49 \pm 0,63$  пг/мл,  $p < 0,001$ ), чем характеризуется повышенной активностью Т-лимфоцитов как компенсаторной реакцией на снижение их содержания в сыворотке крови. Так же установлено, что в первые сутки госпитализации

определялись высокие значения ИЛ-4 ( $7,61 \pm 1,15$  пг/мл), что свидетельствует об активации противовоспалительных механизмов и может нарушить работу фагоцитирующих клеток, тем самым содействуя не только прогрессированию деструктивных процессов в зоне перелома, но и хронизации воспалительного процесса [3]. На 10-12 сутки уровень ИЛ-4 ( $5,52 \pm 0,73$  пг/мл) не отличался от контрольных значений ( $3,95 \pm 0,53$  пг/мл).

В исследуемой группе в первый день госпитализации ММП-1 в сыворотке крови составил  $5,14 \pm 0,61$  нг/мл, что в 5 раз превышало значения контроля ( $0,95 \pm 0,17$  нг/мл,  $p < 0,001$ ), на 10-12 сутки показатели ММП-1 статистически значимо не отличались ( $4,39 \pm 0,56$  нг/мл) от первых суток пребывания в стационаре. Одновременно выявлены достоверно высокие показатели ММП-8 при поступлении пациентов в стационар ( $20,78 \pm 3,92$  нг/мл). На 10-12-е сутки наблюдалась тенденция к снижению уровня ММП-8 ( $12,76 \pm 0,75$  нг/мл), которые статистически значимо не отличались по сравнению с референсными величинами ( $9,75 \pm 1,21$  нг/мл). Уровень ТИМП-1 в исследуемой группе так же был достоверно высоким на протяжении всего лечения пациента в стационаре ( $p < 0,001$ ). При оценке соотношения ММП-1/ТИМП-1 выявлено, что у данной категории больных его уровень был в 4 раза выше контрольных значений ( $p < 0,001$ ). Установлено, что соотношения ММП-1/ТИМП-1 в сыворотке крови в 1-е и на 10–12-е сутки статически значимо не отличались друг от друга ( $0,014 \pm 0,001$  и  $0,011 \pm 0,001$ ). Это свидетельствует о превалировании продукции ММП-1 и относительном дефиците ТИМП-1, что может способствовать усугублению повреждения костной ткани.

Таким образом, обострение хронического посттравматического остеомиелита нижней челюсти определяется выраженным повышением концентрации провоспалительного цитокина в 1-е и 10–12е сутки, а противовоспалительного – только в первые сутки, что свидетельствует о нарушении функционирования как цитокиновой сети организма, так и иммунной системы в целом. Достоверно высокие показатели матриксных металлопротеиназ-1 и 8 ведут к деградации коллагеновых нитей в процессе ремоделирования экстрацеллюлярного матрикса, вследствие чего происходит прогрессирование деструктивных процессов в костной ткани.



## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бережная Е.С., Латюшина Л.С., Долгушин И.И. // Российский иммунологический журнал.– 2014.– том 8 (17).– № 2 (1).– С. 26-29.
2. Кетлинский С.А. Цитокины / С.А. Кетлинский, А.С. Симбирцев // СПб. Фолиант.– 2008.– С. 552.
3. Кузник Б.И. и др. Теоретические и клинические аспекты биорегулирующей терапии в хирургии и травматологии // Новосибирск: Наука.– 2008.– С. 311.
4. Тельных Р.Ю. // Стоматология.– 2008.– № 4.– С. 56-58.

**DYNAMICS RESEARCH OF CYTOKINES AND MATRIX  
METALLOPROTEINASE-1 AND METALLOPROTEINASE-8 DURING  
CHRONIC POSTTRAUMATIC OSTEOMYELITIS OF MANDIBLE**

**Popova E. V., Krasnikov V. E., Ivasik A. S.**

*Vladivostok State Medical University, Vladivostok, Russia*

Exacerbation of chronic post-traumatic osteomyelitis of mandible can be noticed due to increasing of pro-inflammatory cytokine during first and 10-12 day and increasing of anti-inflammatory cytokine during only first day. It constitutes a violation of cytokine network of a body and immune system in general. Reliably high performance of matrix metalloproteinase-1 and metalloproteinase-8 lead to degradation of collagen fibrils in process of extracellular matrix remodelling. It leads to progression of destructive processes in bone tissue.

*Keywords:* chronic osteomyelitis, cytokines, matrix metalloproteinase.

**ОСОБЕННОСТИ ИММУННОГО СТАТУСА ПОСЛЕ  
ПЕРЕНЕСЕННЫХ ОПЕРАТИВНЫХ ВМЕШАТЕЛЬСТВ  
У МУЖЧИН В УСЛОВИЯХ АРКТИКИ**

**Поповская Е. В.<sup>1,2</sup>, Морозова О. С.<sup>1</sup>, Щеголева Л. С.<sup>1</sup>**

*<sup>1</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии природных адаптаций УрО РАН; <sup>2</sup>ГБУЗ АО «Первая городская клиническая больница им. Е. Е. Волоsevич», Архангельск, Россия*

В работе проведен анализ иммунологических данных 30 мужчин, в возрасте от 26 до 49 лет, после перенесенных оперативных вмешательств, жителей г. Архангельска. В периферической крови определяли: концентрацию фенотипов лимфоцитов CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD5<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup>, CD71<sup>+</sup>, CDHLADR<sup>+</sup>, CD95<sup>+</sup>; процент активных фагоцитов в нейтрофилах крови, фагоцитарное число. У мужчин, после перенесенных оперативных вмешательств, выявлено повышенное среднее содержание цитотоксических Т-лимфоцитов (CD8<sup>+</sup>) у 40,00±2,09% обследованных лиц; повышенные уровни натуральных киллеров (CD16<sup>+</sup>) выявлены у 58,33±2,53% людей. Установлены пониженные концентрации Т-клеточного звена иммунитета (CD3<sup>+</sup>, CD5<sup>+</sup>, CD95<sup>+</sup>, CD71<sup>+</sup>, HLA-DR) низкие значения характерны для 100,00±3,31; 95,83±3,24; 89,27±2,30; 90,03±1,14 и 85,89±2,25% лиц, соответственно.

*Ключевые слова:* фенотипы лимфоцитов, оперативное вмешательство, Арктика.

**Актуальность работы.** Состояние здоровья населения интегрально отражает качество жизни, состояние иммунной защиты и степень адаптированности к неблагоприятным условиям [1, 2]. В последние годы достаточно большое внимание уделяется исследованию

функционального состояния адаптационно-компенсаторных механизмов при травматических повреждениях головного мозга. Долевой вклад экологического фактора в ухудшение здоровья и основные формы патологии находятся в пределах 40–60% [3]. Необходимость

такого исследования диктуется высокой частотой указанных травм, возраста пострадавших и инвалидизации. Полученные данные позволят определить параметры, которые помогут прогнозировать характер возможных осложнений. Неблагоприятные климато-экологические условия севера способствуют перенапряжению и нарушению адаптационных механизмов организма, что предполагает хронизацию основных патологических процессов [4].

**Цель работы:** выявить особенности иммунного статуса у мужчин г. Архангельска в возрасте 26-49 лет после перенесенных оперативных вмешательств.

**Используемые методы.** В работе проведен анализ иммунологических данных 30 мужчин, в возрасте от 26 до 49 лет после перенесенных оперативных вмешательств, жителей г. Архангельска, в лаборатории физиологии иммунокомпетентных клеток ФГБУН Института физиологии природных адаптаций УрОРАН, г. Архангельск.

В периферической крови определяли: концентрацию фенотипов лимфоцитов CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD5<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup>, CD71<sup>+</sup>, CDHLADR<sup>+</sup>, CD95<sup>+</sup>; процент активных фагоцитов в нейтрофилах крови, фагоцитарное число. Содержание фенотипов лимфоцитов определяли с помощью непрямой иммунопероксидазной реакции с использованием моноклональных антител (НПЦ «МедБиоспектр», Россия) на препаратах лимфоцитов типа «высушенной капли». Фагоцитарную активность нейтрофилов определяли с частицами латекса, активность нейтрофилов определяли в процентах, интенсивность фагоцитоза – по фагоцитарному числу. Использован пакет прикладных программ математической статистики «Statistica 6.0».

**Основные результаты.** У обследованных мужчин г. Архангельска выявлено крайне низкое содержание Т-лимфоцитов с рецепторами CD3<sup>+</sup> и CD5<sup>+</sup> ( $0,42 \pm 0,03 \cdot 10^9$  кл/л. и  $0,45 \pm 0,05 \cdot 10^9$  кл/л.), значения находятся ниже общепринятых физиологических норм. Дефицит содержания установлен у  $100,00 \pm 3,31\%$  и  $95,83 \pm 3,24\%$  людей. Уровень Т-хелперов (CD4<sup>+</sup>) в среднем составляет  $0,56 \pm 0,07 \cdot 10^9$  кл/л., у  $47,82 \pm 2,29\%$  лиц отмечено снижение показателя ниже границы общепринятых физиологических норм.

Анализ показал, что содержание лимфоцитов с рецепторами CD8<sup>+</sup> находится выше общепринятых границ и составляет  $0,46 \pm 0,05 \cdot 10^9$  кл/л., повышенные концентрации CD8<sup>+</sup> установ-

лены у  $40,00 \pm 2,09\%$  обследованных лиц. Концентрации CD16<sup>+</sup> в среднем составляют  $0,49 \pm 0,03 \cdot 10^9$  кл/л., что находится ближе к верхней границе общепринятых физиологических норм ( $0,25 - 0,5 \cdot 10^9$  кл/л.), при этом повышенные концентрации CD16<sup>+</sup> отмечены у  $58,33 \pm 2,53\%$  людей. Уровень среднего содержания клеток с рецепторами к трансферрину (CD71<sup>+</sup>) и антигенам гистосовместимости класса II (CDHLADR<sup>+</sup>) составляет  $0,44 \pm 0,03 \cdot 10^9$  кл/л. и  $0,46 \pm 0,04 \cdot 10^9$  кл/л.

У обследованных лиц уровень среднего содержания клеток с рецепторами к апоптозу (CD95<sup>+</sup>) составляет  $0,42 \pm 0,03 \cdot 10^9$  кл/л., при этом у  $29,16 \pm 1,79\%$  обследуемых регистрируются повышенные средние значения показателя. Анализ данных показал, что дефицит фагоцитарной защиты характерен для  $58,62 \pm 2,53\%$ , показатель в среднем составил  $48,13 \pm 1,27\%$ , что находится ниже общепринятой границы. Фагоцитарное число составляет в среднем  $5,04 \pm 0,24$  (микроорг./кл.).

Отмечены прямые корреляционные взаимосвязи между CD4<sup>+</sup> и CD5<sup>+</sup> ( $r=0,90$ ;  $p<0,05$ ); CD16<sup>+</sup> и CD71<sup>+</sup> ( $r=0,94$ ;  $p<0,05$ ). Выявлены прямые взаимосвязи между CD95<sup>+</sup> и CDHLADR<sup>+</sup> ( $r=0,90$ ;  $p<0,05$ ); CD16<sup>+</sup> и CDHLADR<sup>+</sup> ( $r=0,82$ ;  $p<0,05$ ); CD71 и CDHLADR<sup>+</sup> ( $r=0,95$ ;  $p<0,05$ ).

Таким образом, у обследованных с неблагоприятным исходом оперативного вмешательства наблюдается развитие иммунологической недостаточности, появляющееся снижением хелперно-индукторной активности клеточного звена иммунной системы, подавлением супрессорно-эффektorной активности Т-лимфоцитов, низким содержанием концентраций Т-клеточных активаторов (CD71, CDHLADR) и апоптоза CD95, что является неблагоприятным прогностическим признаком. Для тяжелой черепно-мозговой травмы, в особенности смертельной, после кратковременного повышения хелперно-индукторной активности Т-лимфоцитов характерно резкое её угнетение.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Банникова Р.В. // Экология человека. – 1994. – № 1. – С. 138-142.
2. Добродеева Л.К. Регуляция метаболических процессов при сахарном диабете II типа / Екатеринбург: РИО УрОРАН, 2014. – 204с.
3. Старченко А.А. Клиническая нейроиммунология хирургических заболеваний головного мозга / С. – Пб., 2001. – 324 с.
4. Шеголева Л.С. Резервные возможности иммунного гомеостаза у человека на Севере/ Екатеринбург: УрОРАН, 2007. – 207 с.

## FEATURES OF THE IMMUNE STATUS AFTER UNDERGOING SURGERY FOR MEN IN ARCTIC CONDITIONS

Popovskaya E. V.<sup>1,2</sup>, Morozova O. S.<sup>1</sup>, Shchegoleva L. S.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Federal state budgetary institution of science Institute of environmental physiology, Ural branch of RAS; <sup>2</sup>SBME of JSC "First city clinical hospital n.a. E. E. Volosevich", Arkhangelsk, Russia

In work the analysis of immunological data 30 men, aged 26 to 49 years, after undergoing surgery, residents of Arkhangelsk. In peripheral blood were determined: concentration of phenotypes of lymphocytes CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD5<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup>, CD71<sup>+</sup>, CDHLADR<sup>+</sup>, CD95<sup>+</sup>; the percentage of active phagocytes in the blood neutrophils, phagocytic number. In men, after undergoing surgery, is characterized by a high average content of cytotoxic T-lymphocytes (CD8<sup>+</sup>) 40,00±2,09% of the persons surveyed; increased levels of natural killer cells (CD16<sup>+</sup>) were detected in 58,33±2,53% of people. The lower concentration of T-cellular immunity (CD3<sup>+</sup>), (CD5<sup>+</sup>), low values are typical for 100,00±3,31% 95,83±3,24%.

*Key words:* lymphocyte phenotypes, surgery, Arctic.

---

---

## ОСОБЕННОСТИ ЦИТОКИНОВОГО ПРОФИЛЯ У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКОЙ ИДИОПАТИЧЕСКОЙ КРАПИВНИЦЕЙ

Русанова Т. С., Юдина С. М., Иванова И. А., Архипова А. В., Сальникова И. Ю., Тарабрина О. В.

*Курский государственный медицинский университет, Курск, Россия*

В статье отражены современные аспекты распространенности, патогенеза хронической крапивницы. Особое внимание уделено сопутствующей патологии желудочно-кишечного тракта, цитокинам и их роли в развитии крапивницы. В публикации также приведены результаты исследования некоторых показателей цитокинового профиля больных хронической идиопатической крапивницей.

*Ключевые слова:* хроническая крапивница, цитокины.

В структуре общей аллергопатологии отмечен значительный рост аллергодерматозов, а среди них – хронической крапивницы. Проблема хронической крапивницы на протяжении многих лет является одной из актуальных и наименее изученных. По данным российских авторов, аллергодерматозы встречаются в среднем у 20% больных аллергическими заболеваниями, а распространенность крапивницы, в зависимости от региона, составляет от 3 до 31% в структуре аллергопатологии [3, 4].

В настоящее время крапивница рассматривается как мультифакториальное заболевание, в патогенезе которого, наряду с генетически

обусловленными иммунными и неиммунными нарушениями, важную роль играют неблагоприятные факторы окружающей среды (ее загрязнение отходами промышленного производства, продуктами неполного сгорания топлива, ксенобиотиками), рост потребления лекарственных препаратов, наличие сопутствующей патологии желудочно-кишечного тракта, глистные инвазии и другие инфекции [2, 4]. Однако механизмы развития заболевания остаются до конца невыясненными. Вместе с тем, большинство исследователей отмечают ключевую роль иммуно-генетических механизмов в развитии и особенностях течения заболевания [1, 3, 5].

До настоящего времени лечение различных форм хронической крапивницы представляет значительные трудности, что обосновывает актуальность дальнейшего изучения механизмов её развития и разработки патогенетически обоснованных методов лечения [4, 5].

С учетом исследований последних лет, установивших существенную роль цитокинов, как универсальных регуляторов функциональной активности иммунокомпетентных и других клеток организма, нами была проведена оценка некоторых показателей цитокинового статуса больных хронической идиопатической крапивницей. Количественная оценка уровней цитокинов (ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-6, ФНО $\alpha$ , ИЛ-4, ИЛ-17, ИЛ-8 и ИНФ $\gamma$ ) в сыворотке крови больных хронической крапивницей проводилась с помощью набора реагентов (ЗАО «Вектор-Бест», г. Новосибирск) методом ИФА.

Под наблюдением было 123 пациента с хронической идиопатической крапивницей в возрасте от 16 до 68 лет (средний возраст – 37,4 $\pm$ 3,12), находившихся на лечении в аллергологическом отделении Курской областной клинической больницы. Среди пациентов преобладали больные со среднетяжелым (72,1%) и тяжелым (27,9%) течением заболевания. Практически все больные в анамнезе имели хроническую патологию желудочно-кишечного тракта: хронический гастрит – 103 пациента (83,7%), хронический гастродуоденит – 19 больных (15,4%), язвенная болезнь желудка и двенадцатиперстной кишки – 9 человек (7,3%), хронический панкреатит – 25 пациентов (20,3%), хронический холецистит – 17 (13,8%), хронический колит и проктит – 13 (10,6%), дисбактериоз кишечника – 47 больных (38,2%). Дуодено-гастральный рефлюкс был выявлен у 21 пациента (17,1%), дискинезия желчевыводящих путей – у 9 (7,3%). Так же у 43 больных (35,0%) были обнаружены антитела к *Helicobacter pylori*, а у 5 пациентов (4%) были обнаружены антитела к аскаридам. Таким образом, наличие сопутствующей патологии желудочно-кишечного тракта и в том числе инфицирование *Helicobacter pylori*, влияет на возникновение и, возможно, определяют тяжесть течения хронической крапивницы. Следует заметить, что у всех больных в анамнезе отсутствовали аллергические заболевания.

При исследовании содержания провоспалительных цитокинов ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-6, ФНО $\alpha$  у всех пациентов в период обострения заболевания было выявлено их значительное повышение в сыворотке крови: ФНО $\alpha$  – в 2,3 раза, ИЛ-1 $\beta$  – в 1,8 раза, ИЛ-6 – в 1,5 раза по сравнению с донорами. Что касается ИЛ-17, то его содержание имело тенденцию к повышению, однако, полученные результаты не были достоверными. Выявленная цитокинемия у больных хронической идиопатической крапивницей в период обострения свидетельствует о выраженной системной воспалительной реакции. Следует заметить, что у большинства больных (67,5%) наблюдалось увеличение ИЛ-10 в 1,6 раза, что косвенно отражает включение в воспалительный процесс компенсаторных супрессорных механизмов на фоне гиперпродукции провоспалительных цитокинов.

Следует также отметить, что изменения уровня ИНФ $\gamma$  были неоднозначными, а именно: в сыворотке крови 69,1% больных содержание ИНФ $\gamma$  было повышено в 1,4 раза по сравнению с нормой, а у 30,9% пациентов уровень ИНФ $\gamma$  не превышал нормальных значений. Это подтверждает многогранность патогенетических механизмов и требует дальнейшего изучения.

Таким образом, у больных хронической идиопатической крапивницей выявлен значительный дисбаланс в цитокиновом профиле, что делает необходимым дальнейшее изучение особенностей патогенеза заболевания и разработку патогенетически обоснованных методов оптимизации терапии.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Баранова Н. И., Коженкова С. В., Ащина Л. А. // Цитокины и воспаление. – 2014. – № 1. – С.15-21.
2. Горячкина Л. А., Дробик О. С., Передельская М. Ю. // Российский аллергологический журнал. – 2011. – № 4. – С. 91-92.
3. Караулов А. В., Юцковский А. Д., Грачева Т. С. // Аллергология и иммунология. – 2013. – Т. 14, № 3. – С.169-173.
4. Хаитов Р. М. Руководство по клинической иммунологии / Р. М. Хаитов, Б. В. Пинегин, А. А. Ярилин – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. – 345 с.
5. Лыкина Т. А., Архипова А. В., Иванова И. А. и др. // Материалы Международного форума «Клиническая иммунология и аллергология – междисциплинарные проблемы» (14–17 мая 2014 г., Казань). – С.140-141

## FEATURES CYTOKINE PROFILE IN PATIENTS WITH CHRONIC IDIOPATHIC URTICARIA

Rusanova T. S., Yudina S. M., Ivanova I. A., Arkhipova A. V., Salnikova I. Y., Tarabrina O. V.

*Kursk State Medical University, Kursk, Russia*

The article reflects the modern aspects of the prevalence, pathogenesis of chronic urticaria. Particular attention is paid comorbidity gastrointestinal tract, cytokines and their role in the development of urticaria. The publication also presents the results of investigations of some indicators of cytokine profile in patients with chronic idiopathic urticaria.

*Key words:* chronic urticaria, cytokines.

---

## ЭТНО-ПОПУЛЯЦИОННЫЕ ОСОБЕННОСТИ ЦИТОКИНОВОГО СТАТУСА У ПАЦИЕНТОВ С МЕТАБОЛИЧЕСКИМ СИНДРОМОМ ЖИТЕЛЕЙ РЕСПУБЛИКИ ХАКАСИЯ

Саранчина Ю. В., Берсенёва О. А., Россова Н. А., Штыгашева О. В., Афанасьева А. А.

*ФГБОУ ВПО «Хакасский государственный университет им. Н. Ф. Катанова»,  
Абакан, Россия*

**Цель.** Определение уровня IL-1 $\beta$ , IL-6 и TNF $\alpha$  в сыворотке крови больных с МС и выявление этно-популяционных особенностей продукции данных цитокинов. **Материалы и методы.** Обследованы 56 женщин с МС (средний возраст 47,9 лет). 1-я группа – с одним компонентом МС (24 чел.), 2-я группа – с наличием двух и более компонентов МС (32 чел.). Концентрации цитокинов определяли методом ИФА-анализа. **Результаты исследования.** У женщин-хакасок наблюдается статистически значимое повышение уровня IL-1 $\beta$  по сравнению с женщинами-европеоидами, у которых наибольшей была продукция IL-6. Содержание TNF $\alpha$  в обеих популяциях не имело значимых различий. **Выводы.** В реализации МС наблюдаются этно-популяционные различия, которые выражаются в продукции провоспалительных цитокинов.

*Ключевые слова:* метаболический синдром, интерлейкины, хакасы.

**Введение.** Одним из наиболее обсуждаемых в последние годы процессов является хроническое субклиническое воспаление на фоне метаболического синдрома (МС). Выявлено, что воспалительный процесс решающим образом сказывается на метаболической и секреторной функции жировой ткани и играет ведущую роль в развитии сопровождающих ожирение патологических процессов (Шварц В., 2009, Россова Н. А., 2014). Требующим дополнительных изучений фактом, является существование такого явления как популяцион-

ный диморфизм провоспалительного статуса на фоне МС, то есть существование особенностей развития воспалительных реакций у пациентов с МС в разных этнических группах. В связи с чем, целью данного исследования является определение уровня интерлейкинов IL-1 $\beta$ , IL-6 и TNF $\alpha$  в сыворотке крови больных с метаболическим синдромом и выявление этно-популяционных особенностей продукции данных цитокинов.

**Материалы и методы исследования.** Обследованы 56 женщин с МС. Средний возраст

пациентов – 47,9±9,0 лет. Пациенток разделили на 2 группы: в 1-ю группу включено 24 человека, у которых было установлено наличие одного компонента МС согласно критериям, изложенным в рекомендациях ВНОК и РМО-АГ по диагностике и лечению МС (2009). Вторую группу составили 32 человека с наличием двух и более компонентов МС. Для изучения явления этнического полиморфизма всех обследуемых также разделили на группы пришлое и коренного населения. К коренному населению относили монголоидов-хакасов, у которых не было смешанных браков среди представителей трех предшествующих поколений, а к пришлому населению – европеоидов, не менее 5 лет проживающих на территории Хакасии. Концентрации цитокинов: IL-1 $\beta$ , IL-6 и TNF $\alpha$  в сыворотке крови определяли методом ИФА-анализа («Вектор-Бест», г. Новосибирск). Результаты обработаны с применением стандартного пакета программ Statistica 8.0. Статистический анализ полученных данных проводили по группам: однокомпонентный МС, многокомпонентный МС, коренное и пришедшее население. Результаты представлены в виде медианы и квартилей (Me (Q1-Q3)). Также были определены корреляционные связи между качественными показателями IL-1 $\beta$  и IL-6 в разных группах выборки с помощью расчета критерия Спирмена (R). Значимыми считали различия при уровне критерия Манна-Уитни,  $p \leq 0,05$ .

**Результаты исследования.** В ходе определения содержания цитокинов у женщин с однокомпонентным МС было выявлено, что уровень IL-1 $\beta$  в сыворотке крови у женщин-хакасок не имел статистически значимых различий по сравнению с данным показателем у женщин европеоидной популяции и составил 11,9 (0,0–16,8) пг/мл и 12,4 (5,7–14,6) пг/мл соответственно. Уровень IL-6 у женщин хакасской популяции составил 3,8 (0,0–4,9) пг/мл; у женщин-европеоидов – 2,6 (1,8–6,6) пг/мл. Изменений в продукции TNF $\alpha$  в обследуемых группах не установлено. Так, уровень TNF $\alpha$  у женщин европеоидной популяции составил 2,4 (1,6–2,5) пг/мл, у женщин хакасской национальности – 1,5 (0,0–3,2) пг/мл.

При оценке продукции цитокинов у пациентов, имеющих многокомпонентный МС было показано, что у женщин хакасской популяции уровень IL-1 $\beta$  статистически значимо выше по сравнению с данным показате-

лем у женщин европеоидной популяции [10,6 (0,0–16,2) пг/мл и 0,8 (0,0–2,3) пг/мл,  $p \leq 0,05$ ]. Содержание IL-6 было статистически значимо ниже у женщин коренного населения по сравнению с женщинами пришлое населения [1,0 (0,0–3,9) пг/мл и 9,9 (4,3–20,4) пг/мл,  $p \leq 0,05$ ]. Изменения уровня TNF $\alpha$  в сыворотке крови не наблюдалось ни в одной из обследуемых групп и составил у женщин хакасской популяции – 1,9 (0,0–3,4) пг/мл и у женщин европеоидной популяции – 1,5 (0,2–3,6) пг/мл. Различия не имели статистически значимых различий.

**Обсуждение результатов.** Висцеральная жировая ткань, вовлекаясь в процесс воспаления, является источником ряда высокоактивных веществ – адипокинов, которые отвечают не только за гомеостаз ткани, регулирование обмена веществ и энергии, уровня глюкозы, но и вносят вклад в развитие хронического «тлеющего» воспалительного процесса в организме тучных людей. Известно, что жировая ткань при ожирении секретирует различные воспалительные цитокины, такие как IL-6, TNF $\alpha$  и др. (Шварц В., 2009). Полагают, что нарушенная регуляция продукции этих провоспалительных медиаторов над противовоспалительными адипокинами (адипонектин) является главным механизмом, лежащим в основе неблагоприятных метаболических и сердечно-сосудистых последствий (Itoch M., 2011). Активация провоспалительных метаболических путей в адипоцитах ослабляется при накоплении триацилглицеролов и увеличивает высвобождение свободных жирных кислот, избыток которых вызывает инсулинорезистентность в мышцах и печени (Holland W.L., 2011). Таким образом, хроническое воспаление, по-видимому, является клинически важным изменением, развивающимся в жировой ткани, когда наступает ожирение (Itoch M., 2011). Полученные результаты показали, что как у женщин хакасской популяции, так и у женщин европеоидной популяции наблюдается повышение концентрации провоспалительных цитокинов в сыворотке крови. При этом, вероятно, в патогенезе однокомпонентного МС ключевую роль играет повышение IL-1 $\beta$ , запускающего развитие воспалительной реакции в жировой ткани. Кроме того, в продукции данного цитокина популяционных особенностей не наблюдается. В случае многокомпонентного МС между женщинами, относящимися к ко-

ренному и пришлому населению Хакасии были выявлены различия. Вероятно, в популяции хакасских женщин в механизме реализации МС преобладают плейтропные эффекты IL-1 $\beta$ , о чем свидетельствует обнаруженный его высокий уровень в сыворотке крови. У женщин европеоидной популяции наибольшей была продукция IL-6. Возможно, именно гиперпродукция IL-6 может рассматриваться как патологический маркер многокомпонентного МС у женщин-европеоидов. Таким образом, выявленные особенности продукции цитокинов показали, что в реализации МС наблюдаются этно-популяционные различия, которые необходимо учитывать для эффективной терапии.

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки России в рамках базовой части государственного задания.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Берсенёва О. А., Агеева Е. С. Сибирское медицинское обозрение. 2014; 5: 71-74.
2. Россова Н. А., Саранчина Ю. В., Берсенёва О. А. и др. Российский иммунологический журнал. 2014; 8 (17) 3: 378-380.
3. Шварц В. Проблемы эндокринологии. 2009; 55 (4): 44-49.
4. Holland W.L., Bikman B. T., Wang L.P et al. J. Clin. Invest. 2011; 121: 1858-1870.
5. Itoch M., Suganami T., Hachiya R., Ogawa Y. Adipose Int. J. Inflamm. 2011; 2011: 1-8.

### ETHNO-POPULATION CHARACTERISTICS OF CYTOKINE STATUS IN PATIENTS WITH METABOLIC SYNDROME RESIDENTS OF THE REPUBLIC OF KHAKASSIA

**Saranchina Yu.V., Bersenyova O.A., Rossova N.A.,  
Shtygasheva O.V., Afanas'eva A.A.**

*Federal State-Funded Educational Institution of Higher Professional Education  
«Katanov Khakass State University», Abakan, Russia*

The aim of the study: to determine the level of IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF $\alpha$  in the serum of patients with MS and the identification of ethno-population characteristics of the product of these cytokines. Materials and methods: A total of 56 women with MS (the average age – 47,9 years). 1st group – with one component of MS (24 people), the 2nd group – with the presence of two or more components of MS (32 people). The concentration of cytokines was determined by ELISA analysis. All subjects were also divided into groups of alien and indigenous people. The concentration of cytokines was determined by ELISA analysis. The results of the study. Women khakas observed a statistically significant increase of IL-1 $\beta$  compared with female caucasians, who was the greatest production of IL-6. The content of TNF $\alpha$  in both populations had significant differences. Conclusions: ethno-population differences observed the implementation of the MS, which are expressed in the production of proinflammatory cytokines.

*Key words:* metabolic syndrome, interleukins, khakas people

## МАТРИЧНАЯ РНК ИЛ-5 В КАЧЕСТВЕ МИШЕНИ АНТИЦИТОКИНОВОЙ ТЕРАПИИ АТОПИЧЕСКОГО ДЕРМАТИТА

Силков А. Н.<sup>1</sup>, Боярских У. А.<sup>2</sup>, Филипенко М. Л.<sup>2</sup>,  
Ковалевская-Кучерявенко Т. В.<sup>1</sup>, Сенникова Ю. А.<sup>3</sup>,  
Непомнящих В. М.<sup>1</sup>, Сенников С. В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБНУ "НИИ фундаментальной и клинической иммунологии"; <sup>2</sup>ФГБНУ Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук; <sup>3</sup>ГБОУ ВПО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Новосибирск, Россия

Атопический дерматит (АД) – распространенное аллергическое заболевание кожи, имеющее мультифакториальную природу. Ключевым событием в иммунной системе при АД является повышение цитокинов Th-2 типа, которое приводит к увеличению уровня IgE, активации тучных клеток и эозинофилов. Блокирование активности ИЛ-5, с помощью моноклональных антител для терапии аллергических заболеваний оказалось достаточно успешным. Однако в отношении атопического дерматита эффективность анти-ИЛ-5 моноклональных антител оказалась недостаточной. Экспериментальные данные свидетельствуют, что локализованная активация эозинофилов может происходить в результате секреции ИЛ-5 мигрировавшими мононуклеарными клетками. Блокирование негативных эффектов ИЛ-5 и повышения эффективности анти-ИЛ-5 терапии при атопическом дерматите возможно при подавлении экспрессии его гена в иммунокомпетентных клетках, мигрирующих в очаги воспаления.

*Ключевые слова:* атопический дерматит, антицитокиновая терапия, ИЛ-5.

**Введение.** Атопический дерматит (АД) – распространенное аллергическое заболевание кожи, имеющее мультифакториальную природу. Основой патогенеза АД является результат взаимодействия факторов генетической предрасположенности, изменений в структуре и функционировании эпидермального барьера и иммунологические нарушения. Известно, что важным компонентом в патогенезе АД являются IgE, тучные клетки и эозинофилы. В качестве ключевого события в иммунной системе при АД рассматривается дисбаланс между иммунорегуляторными белками – цитокинами Т-хелперов 1 и 2 типа, который приводит к увеличению уровня IgE, активации тучных клеток [1]. На фоне нарушения свойств кератиноцитов, это способствует формированию хронических очагов аллергического воспаления в коже. В реализации иммунных реакций при атопическом дерматите цитокины занимают важное место и могут быть использованы как в целях диагностики, так и применены

для разработки цитокиновых и антицитокиновых стратегий терапии.

Важная роль при атопических заболеваниях отводится эозинофилам. Известно, что у большинства пациентов с АД отмечается эозинофилия, а также инфильтрация кожных очагов активированными эозинофилами. Ключевым фактором активации эозинофилов является ИЛ-5 [2]. В качестве антицитокиновой терапии атопических заболеваний был предложен подход блокирования активности ИЛ-5. Блокирование ИЛ-5 проводилось с помощью моноклональных антител и олигонуклеотидов, блокирующих ИЛ-5, мутантных белков, блокирующих рецептор ИЛ-5, а также генетических векторов кодирующие их [3–5]. В целом использование анти-ИЛ-5 терапии аллергических заболеваний оказалось достаточно успешным и характеризовалось снижением тяжести течения и выраженности аллергических симптомов, в том числе снижением эозинофилии. Однако в отношении атопического дерматита



эффективность анти-IL-5 моноклональных антител оказалась недостаточной. Проведенные испытания показали недостаточность блокирования системного белка IL-5 при АД, указывая на значительный вклад в патогенез этого заболевания местных воспалительных реакций в коже (*in situ*) [5].

**Методы исследования.** Сравнительное исследование системного (сывороточного) уровня цитокинов и уровня их экспрессии мононуклеарными клетками периферической крови в норме и у больных атопическим дерматитом проведено с использованием наборов Bio-Plex Pro Human Cytokine Assay, 27-Plex на автоматическом двухлучевом лазерном анализаторе Bio-Plex Protein Assay System (Bio-Rad). Определение уровня мРНК генов цитокинов *TNF*, *IFNG*, *IL1 $\beta$* , *IL4*, *IL5*, *IL13*, выполнено с помощью ПЦР в реальном времени. Реакции амплификации выполнялась при помощи термоциклера с оптическим блоком для детекции CFX96 (Bio-Rad). Возможность регистрации флуоресценции в режиме реального времени достигалась за счет добавления в реакционную смесь инттеркалирующего красителя SYBRGreen I.

**Результаты и обсуждение.** В сыворотке крови у больных атопическим дерматитом регистрируется значимое повышение уровня провоспалительных цитокинов и хемокинов – IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, MIP- $\alpha$ , Eotaxin, а также Th2 цитокинов – IL-4, IL-13 и IL-5

В сыворотке IL-5 в норме регистрировался на уровне 4,4 (3,8–5,1) у больных на уровне 6,8 (5,3–7,7). В противоположность системному сывороточному уровню, при анализе уровня цитокинов в культурах мононуклеарных клеток от больных выявляется супрессия их цитокинсинтезирующей функции *in vitro*. Особенно заметен дефект продукции цитокинов мононуклеарными клетками больных при стимуляции митогеном. Значимое снижение уровня в сравнении с донорскими значениями выявлено для ряда цитокинов, в том числе IL-5. Анализ количества мРНК в мононуклеарных клетках периферической крови при атопическом дерматите подтвердил снижение количества мРНК IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , MCP-1. Однако уровень мРНК IL-5 у больных был значимо повышен 63,5 (26,5–89,8) против 59,4 (28,2–91,5) в норме.

Учитывая, что поддержание местных воспалительных реакций в коже при атопическом дерматите происходит в результате миграции активированных иммунокомпетентных клеток из периферического кровотока. Эти клетки обеспечивают критический уровень провоспалительных цитокинов в кожных очагах. В частности локализованная активация эозинофилов может происходить в результате секреции IL-5 мигрировавшими клетками из числа РВМС. Мы предполагаем, что для блокирования негативных эффектов IL-5 и повышения эффективности анти-IL-5 терапии при атопическом дерматите необходимо подавление экспрессии его гена в иммунокомпетентных клетках, мигрирующих в очаги воспаления. Подавление экспрессии IL-5 возможно различными способами, например разрушение мРНК с помощью РНК интерференции (специфическими siRNA) или блокирования антисмысловыми нуклеиновыми кислотами.

Блокирование экспрессии гена в клетках периферического кровотока позволит сократить количество продуцентов IL-5 в каждом фильтрате. Специфические siRNA могут выступать также в качестве альтернативы или в качестве дополнения блокаторам IL-5 белковой природы -антителам. Комбинация антител и РНК интерференции, возможно, значительно снизит системные и локальные эффекты IL-5 и повысит эффективность анти-IL-5 терапии атопического дерматита.

Работа выполнена при поддержке: ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2012 годы» (ГК № 16.512.11.2245)

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Liu F. T., Goodarzi H., Chen H. Y. Clin Rev Allergy Immunol. 2011 Dec;41 (3): 298-310.
2. Kotsimbos A. T., Hamid Q. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1997;92 Suppl 2: 75-91.
3. Huang H. Y., Lee C. C., Chiang B. L. Gene Ther. 2008 May;15 (9): 660-7.
4. Zeng D., Cao Y., Song Q. et al. Respirology. 2010 Jan;15 (1): 132-40.
5. Corren J. Discov Med. 2012 Apr;13 (71): 305-12.

## mRNA AS A TARGET FOR ANTI-IL-5 THERAPY OF ATOPIC DERMATITIS

Silkov A. N.<sup>1</sup>, Boyarskih U. A.<sup>2</sup>, Filipenko M. L.<sup>2</sup>, Kovalevskaya-Kucheryavenko T. V.<sup>1</sup>,  
Sennikova Y. A.<sup>3</sup>, Nepomnyashchikh V. M.<sup>1</sup>, Sennikov S. V.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, <sup>2</sup>Institute of Chemical Biology  
and Fundamental Medicine, <sup>3</sup>Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russia

Atopic dermatitis (AD) is a widespread allergic skin disease of multifactorial character. The key event in the immune system of AD is an increase in Th-2-type cytokines, which results in increased IgE and activation of mast cells and eosinophils. Blocking of IL-5 activity with the help of monoclonal antibodies for therapy of allergic diseases has proved ineffective. The therapeutic effectiveness of anti-IL-5 monoclonal antibodies in relation to AD has also been found insufficient. Localized activation of eosinophils could take place as a result of IL-5 secretion by migrated mononuclear cells. Blocking of the negative effects of IL-5, and increase in the effectiveness of anti-IL-5 therapy might be done by inhibiting its gene expression in immunocompetent cells migrating to inflammation nidi.

*Key words:* atopic dermatitis, anticytokine therapy, IL-5.

## ЦИТОКИНОВАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ПРОЛИФЕРАЦИИ ПРИ МНОЖЕСТВЕННЫХ ПАПИЛЛОМАХ КОЖИ

Степанова О. В., Писклакова Т. П.

ГБОУ ВПО Южно-Уральский государственный медицинский университет,  
Челябинск, Россия

Обследовано 63 пациента с множественными папилломами кожи. Показана наибольшая поражаемость папилломами кожи шеи и подмышечных впадин (до 80%), чаще встречался бороздной вариант папиллом, гистологически в 80% установлен плоскоклеточный тип. Установлено повышение в крови пациентов с множественными папилломами кожи уровня эпидермального фактора роста, интерлейкина-12 и на уровне тенденции конечных стабильных метаболитов оксида азота, свидетельствующее об активации процессов пролиферации эпидермиса, процессов антигенной презентации, с формированием условий для включения Th1-зависимого иммунного ответа.

*Ключевые слова:* множественные папилломы кожи, эпидермальный фактор роста, интерлейкин-12, оксид азота.

Папилломы кожи, или плоскоклеточные кератозы являются одними из часто встречающихся дерматозов и относятся к доброкачественным опухолям, гистогенетически связанным с эпидермисом. согласно гистологической классификации ВОЗ (1980) папиллома (*papilloma*; лат. *papilla* сосок + *-ōma*, синоним: сосочковый полип, сосочковая фиброэпителиома) – доброкачественное новообразование, развивающееся из эпителия, имеет вид сосочкового разрастания, выступающего над поверхностью окружающей ткани. Формирование папилломы можно считать результатом

избыточного развития эпидермиса, вследствие чего возникают сосочковые выступы, увлекающие за собой соединительную ткань [1]. Малоисследованными остаются механизмы иммунного реагирования и изменение цитокинового статуса на развитие множественных папиллом кожи. Имеются сведения о рецидивировании папиллом кожи при наличии супрессии клеточного компартмента иммунитета [2]. Вместе с тем, изучение иммунного статуса при множественных папилломах кожи перспективно для разработки и применения патогенетически ориентированных методов иммунокоррекции.

**Целью исследования** явилось изучение уровня цитокинов-регуляторов клеточного роста, метаболитов оксида азота при различных клинических формах множественных папиллом кожи.

**Материалы и методы:** В исследование включены 63 пациентов с множественными папилломами кожи (основная группа), из них женщин – 53 чел. (84,1%), средний возраст  $44,2 \pm 3,7$ , мужчин – 10 чел. ( $15,8 \pm 3,9$  лет). Диагноз верифицирован на основании гистологического исследования. Группу сравнения составили 30 условно-здоровых лиц, средний возраст  $42,6 \pm 3,6$ . Материал для исследования: биоптаты папиллом, венозная кровь. Срезы окрашивались по общепринятым методикам, исследование включало описание клеточных элементов, степень дифференцировки, протяженность измененного участка, состояние эпителиальных слоев. Для изучения иммунных показателей проводили забор венозной крови, натошак. Определение в крови эпидермального фактора роста (EGF), IL-12 проводилось методом ИФА с тест-системами производства ЗАО «БиоХим-Мак» г. Новосибирск. Учет проведен на планшетном фотометре «Multiscan plus» (Labsystem, Финляндия). Уровень продукции эндогенного оксида азота оценивали по концентрации конечных стабильных метаболитов оксида азота с помощью реакции Гриса, используя метод Н. Л. Емченко с соавторами (1994) в модификации Коробейниковой Э. Н. (2002). Статистическая обработка материала проводилась с использованием пакета лицензионных прикладных программ «STATISTIKA 6.0». Сравнение данных проводили согласно непараметрическому критерию Манна-Уитни.

**Результаты и обсуждение:** Изучение гистоморфологических особенностей строения папиллом показало, что самой распространенной формой является 1 тип (плоскоклеточная папиллома), определяемая у 81,1% женщин и 70% мужчин, 2 тип (переходноклеточная) встречался в 9,4% у женщин и 20% случаев у мужчин. Наименее часто встречались 3 (фибропапиллома) и 4 (погружная) типы, как в группе женщин, так и мужчин. Топографически, наиболее часто папилломы локализовались на коже шеи и подмышечных впадин (в среднем более 80% пациентов, как женщин, так и мужчин), т.е. в области естественных впадин и складок кожи. Менее распространены папилломы в субмаммарной области у женщин и на коже головы, в среднем

около 10% случаев. Часто встречались папилломы сочетанной локализации, захватывающей кожу шеи, подмышечных впадин, субмаммарную область и кожу головы.

Наиболее распространенной клинической разновидностью папиллом у больных, являлись бороздные папилломы, топографически привязанные к кожным бороздам и повторяющие микрорельеф кожи, которые встречались в 100% наблюдений, как у мужчин, так и у женщин, далее в порядке уменьшения встречалась нитевидная форма папиллом представленная в 26,4% у женщин и в 20% у мужчин, реже наблюдались большие мешковидные варианты папиллом (7,5% – женщины, 10% – мужчины). Сочетанные формы, в том числе погружные варианты папиллом и фибропапилломы встречались у 42 человек (66,6%).

Изучение процессов регуляции клеточного роста проводилось на основе определения количества сывороточного эпидермального фактора роста (EGF), уровня конечных стабильных метаболитов оксида азота. Для оценки условий формирования иммунного ответа на развитие доброкачественной эпителиальной опухоли, определяли количество регуляторного цитокина IL-12, продуцируемого преимущественно клетками врожденного иммунитета, в т.ч. эпителиоцитами и дендритными клетками, осуществляющего повышающую регуляцию в отношении дифференцировки Th1-лимфоцитов. Нами установлено, что в крови у пациентов с множественными папилломами кожи имеет место повышение уровня эпидермального фактора роста (EGF) в 1,45 раза в сравнении с группой сравнения, играющего ключевое значение в регуляции клеточного роста опухолей эпителиального происхождения. Специфически связываясь с рецепторами на поверхности клеточных мембран, EGF ускоряет рост клеток эпителия, эндотелия, фибробластов, кератиноцитов, усиливает пролиферацию тканей и хемотаксис клеток, играет важную роль в регуляции обменных и восстановительных процессов, а также относится к онкомаркерным белкам. Полученные данные соответствуют литературным о повышении уровня этого ростового фактора в крови у пациентов с доброкачественными опухолями. Нами зафиксирован достоверный в 1,7 раза количественный рост уровня регуляторного цитокина IL-12 у пациентов с папилломами. Рост IL-12 в циркуляции отражает усиление

функции АПК клеток и формирует условия для включения Th1-зависимого иммунного ответа, что сопровождается параллельным увеличением в циркуляции Т-лимфоцитов, обладающих цитотоксическим действием, т.е. участвующих в контроле и элиминации клеток, уклоняющихся в своем генетическом развитии. Уровень терминальных стабильных метаболитов оксида азота в крови у пациентов с множественными папилломами кожи имел отчетливую тенденцию роста. Известно, что оксид азота является универсальным микробо- и вирулицидным фактором, способным синтезироваться *de novo* при активации макрофагов. Метаболиты оксида азота оказывают системный и локальный вазодилатирующий эффект, влияют на процессы роста клеток и тканей организма.

Таким образом, наиболее распространенной клинической разновидностью множественных папиллом кожи являются бороздные варианты с локализацией в естественных впадинах

и бороздах кожи, гистологически – чаще имеет место плоскоклеточный тип папилломы. При этом, установленное нами повышение в крови пациентов с множественными папилломами кожи уровня эпидермального фактора роста, интерлейкина-12 и на уровне тенденции конечных стабильных метаболитов оксида азота свидетельствует об активации процессов пролиферации эпидермальных клеток, сопровождающихся усилением функции антигенной презентации, микробо- и вирулицидного потенциала, с формированием условий для включения Th1-зависимого иммунного ответа,

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кошевенко Ю.Н. Справочник по дерматокосметологии, – М.: «Академия косметологии». – 2005. – 167 с.
2. Баткаев Э. А., Кицак В. Я., Корсунская И. М., Липова Е. В. Вирусные заболевания кожи и слизистых. – М.: Пульс. – 2001. – С. 45-50.

### CYTOKINE REGULATION PROLIFERATION AT A MULTIPLICITY OF SKIN PAPILLOMAS

Stepanova O. V., Pisklakova T. P.

*Medical University of South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russia*

A total of 63 patients with multiple papillomas of the skin, show cities account for major susceptibility of skin papillomas of the neck and armpits (80%), more common option Borozdna papillomas, histologically in 80% of squamous type installed. Elevated blood of patients with multiple skin papillomas levels of epidermal growth factor and interleukin-12 trend at final stable metabolite of nitric oxide, which indicates an activation of epidermal proliferation, antigen presentation processes, the formation conditions for the incorporation of Th1-dependent immune response.

*Key words:* multiple skin papillomas, epidermal growth factor, interleukin-12, nitric oxide.

### ВЛИЯНИЕ ЭРИТРОПОЭТИНА НА ЦИТОКИНПРОДУЦИРУЮЩУЮ АКТИВНОСТЬ Т-КЛЕТОК

Тодосенко Н. М., Селедцов В. И.

*Центр медицинских биотехнологий, Калининград, Россия*

Показано, что эритропоэтин (Еро) способен усиливать продукцию интерлейкина-2 (ИЛ-2) и интерлейкина-10 (ИЛ-10), осуществляемую активированными Т-лимфоцитами. Противоположное супрессорное влияние Еро оказывал на Т-клеточную продукцию интерферона-гамма (ИФН-γ) и интерлейкина-17 (ИЛ-17). Значимого влияния Еро на выработку ИЛ-4 не выявлено. Полученные данные указывают на наличие прямого регуляторного влияния Еро на Т-клеточные адаптивные реакции.

*Ключевые слова:* эритропоэтин, Т лимфоциты, цитокины

**Актуальность и цель работы.** Эритропоэтин (Еро) представляет собой гликопротеин (Мг=34 кДа), продуцируемый у взрослого человека, в основном, почками. ЭПО относится к группе цитокинов 1 класса, участвует в поддержании жизнеспособности и пролиферации кроветворных клеток. Основная функция Еро – поддержание эритропоэза [1].

Ранее показано, что рецепторы к Еро экспрессируются на CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитах [2]. На активированной Т-клетке их количество может достигать 1000 и достигать значения типичного для эритроидных клеток-предшественников [3]. Вместе с тем, прямые эффекты эритропоэтина на функциональные свойства Т-лимфоцитов мало исследованы.

**Цель** настоящей работы – оценить прямое влияние Еро на цитокинпродуцирующую активность Т- лимфоцитов.

**Материалы и методы.** Объектом исследования являлись Т-лимфоциты, выделенные из периферической крови 6 здоровых доноров (3 женщины, 3 мужчины; возраст 34±12 лет). Мононуклеарные клетки (МНК) получали посредством центрифугирования крови на градиенте плотности фиколл-гепака (p=1,077±0,001 г/мл, Ficoll-Paque™ Premium, GE Healthcare). Т-клетки выделяли из МНК методом колоночной магнитной сепарации с использованием частиц, конъюгированных с анти-CD3 антителами (Miltenyi Biotech, Германия), согласно инструкции производителя. По данным цитофлуорометрического анализа (Accuri C6, BD Biosciences, США), содержание CD3<sup>+</sup> лимфоцитов в выделенных клетках составляла не менее 95%. CD3<sup>+</sup> клетки (/мл) культивировали в бессывороточной среде TexMACS (Miltenyi Biotech, Germany) с частицами, конъюгированными с антителами к молекулам CD3, CD28 и CD2 (T cell activation/Expansion Kit human, Miltenyi Biotech, Germany), или без них в контроле в течение 48 ч во влажной атмосфере, при 37 °С. Перед культивированием в опытные пробы добавляли эритропоэтин- в (Еро, Sigma, США) в концентрации 0,25, 0,5, 1 и 1,25 мкг/мл. После культивирования клеточные супернатанты анализировали на содержание цитокинов на мультиплексном анализаторе BioPlex 200 (BioRad, США) с использованием коммерческого набора Human cytokine/chemokine immunoassay (Milliplex, Millipore, CIF). Статистический анализ дан-

ных проводили с использованием t-критерия Стьюдента.

**Результаты.** Согласно полученным данным, Еро не оказывал существенного влияния на продукцию интерлейкина-2 (ИЛ-2), ИЛ-4, ИЛ-10 и ИЛ-17 покоящимися Т-лимфоцитами. Наши результаты, свидетельствуют о том, что Еро-в оказывал умеренный, дозо-зависимый стимулирующий эффект на продукцию активированными Т-лимфоцитами ИЛ-2 и ИЛ-10. В тоже время, в пробах с Еро были отмечены выраженная ингибция продукции интерферона-γ (ИФН-γ) и умеренное снижение выработки ИЛ-17. Значимого однонаправленного влияния Еро на ИЛ-4 продукцию Т-клетками не обнаружено.

Результаты наших исследований согласуются с опубликованными данными о прямом влиянии лечения Еро на секрецию ИЛ-2, ИЛ-10 и параметров активации CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов у гемодиализных пациентов с хронической почечной недостаточностью [2, 4]. Можно предполагать, что через усиление клональной экспансии антиген-специфичных Т-клеток Еро может способствовать формированию иммунной памяти. Однако такое усиление может ограничиваться ИЛ-10, выработка которого Т-клетками согласно нашим и литературным данным [4] также усиливается Еро. Нами выявлен супрессорный эффект Еро на продукцию ИФН-γ и ИЛ-17.

В целом, полученные данные согласуются с представлением о том, что Еро способен супрессировать активность опосредуемых Th1 процессов и этим частично объясняется его противовоспалительная активность. В клинике Еро активно используется как стимулятор эритропоэза. В целом, имеющиеся данные указывают на целесообразность клинического использования Еро в качестве иммуномодулятора, например, при лечении ревматоидного артрита. На наш взгляд, применение Еро может быть также клинически оправданным при лечении рассеянного склероза и других заболеваний, в развитии которых ключевую роль играют аутоиммунные Th1.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Меркулов В. А., Солдатов А. А., Авдеева Ж. И., Алпатова Н. А., Гайдерова Л. А. и соавт. Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение 2013, 3 (47), 4–11.
2. Lisowska K. A., Bryl E., Witkowski J. M. Haematologica 2011, 96, 12-13.

3. Lisowska K. A., Frackowiak J. E., Mikosik A., Witkowski J. M. PLOS ONE 2013, 8, 1–8.
4. Lisowska K. A., Dkbska-Hliziec A., Jasiulewicz A., Dasa A., Bryl E., Witkowski J. M. J Clin Immunol 2013, 33, 661–665.

## EFFECT OF ERYTHROPOIETIN ON CYTOKINE ACTIVITY OF T-CELLS

Todosenko N., Seledtzov V. I.

Center of Medical Biotechnology, Kaliningrad, Russia

It is shown that erythropoietin (Epo) is able to amplify the production of interleukin-2 (IL-2) and interleukin-10 (IL-10) realized by activated T lymphocytes. Epo opposite suppressive effect was exerted on T-cell production of interferon-gamma (IFN-g) and interleukin-17 (IL-17). Significant effect of Epo on the production of IL-4 has been identified. The data obtained indicate the presence of Epo direct regulatory effect on T-cell adaptive responses.

## СТИМУЛЯЦИЯ *EX VIVO* ЭКСПРЕССИИ ПРОАЛЛЕРГИЧЕСКИХ ТКАНЕВЫХ ЦИТОКИНОВ В КЛЕТКАХ МЫШИНОЙ ТРАХЕИ

Чудаков Д. Б.

ФГБУН Институт биоорганической химии им. акад. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова, РАН, Москва, Россия

Тканевые цитокины (интерлейкины-25 и -33 (ИЛ-25 и ИЛ-33), а также тимический стромальный лимфопоэтин (ТСЛП) способны индуцировать продукцию цитокинов аллергического воспаления ИЛ-4, -5 и -13 в клетках иммунной системы. Целью данной работы было идентифицировать стимулы, вызывающие продукцию данных цитокинов в эпителии трахеи. В качестве стимулов были взяты различные протеазы, липополисахарид (LPS), формил-метионил-лейцил-фенилаланин (fMLP),  $\beta$ -аланин. Стимуляцию проводили *ex vivo* на эксплантах мышинной трахеи. Экспрессию генов исследовали методом качественной полимеразной цепной реакции ПЦР. Была установлена небольшая спонтанная продукция ИЛ-33, но не ИЛ-25 и ТСЛП, эксплантами трахеи. Ни один из стимулов не индуцировал продукции ИЛ-25. Показано, что протеазы в ряде случаев (особенно коллагеназа) индуцировали продукцию ТСЛП, увеличивали продукцию ИЛ-33. fMLP стимулировал продукцию как ИЛ-33, так и ТСЛП.  $\beta$ -аланин стимулировал продукцию только ИЛ-33. Ни один из стимулов не индуцировал экспрессию цитокинов в тканях пищевода. Таким образом, эпителий трахеи был способен сортировать сигналы в зависимости от типа стимулов. Эпителий пищевода был нечувствителен к стимулам. Для индукции экспрессии ИЛ-33 и ТСЛП в мышинной модели респираторной аллергии могут использоваться коллагеназа и fMLP.

**Ключевые слова:** интерлейкины 25 и 33, тимический стромальный лимфопоэтин, протеазы, fMLP,  $\beta$ -аланин, аллергия.

**Актуальность и цель работы.** В настоящее время повсеместно наблюдается рост распространённости и числа различных аллергических заболеваний. Данные заболевания, в числе которых астма, аллергический ринит, пищевая аллергия, протекают по механизму,

обусловленному наличием специфических к различным аллергенам антител класса IgE [1]. Переключение В-клеток на синтез IgE опосредовано интерлейкинами (ИЛ) 4 и 13, продуцируемыми Т-хелперами 2 (Th2) [1, 2]. Недавно был открыт новый класс клеток

врождённой иммунной системы, способных в ответ на тканевые цитокины ИЛ-25,-33 и тимический стромальный лимфопоэтин (ТСЛП) продуцировать тот же набор цитокинов, что и T<sub>H</sub>2: ИЛ 4 и 13 [2, 3]. Тканевые цитокины высвобождаются клетками барьерного эпителия (дыхательных путей, ЖКТ, кожи) в ответ на некоторые агонисты Toll-подобных рецепторов (ИЛ 25 и ТСЛП), протеазы (ИЛ 25, 33, ТСЛП), в процессе некроза (ИЛ 33) [2].

**Целью** данной работы было определение экспрессии генов ИЛ 25, 33 и ТСЛП в клетках мышинной трахеи и пищевода в ответ на различные индукторы.

**Материалы и методы.** Мышей линии BALB/c забивали, выделяли трахею и пищевод, фрагменты тканей помещали в лунки 24-луночного планшета и стимулировали различными индукторами в течение 4 часов при +37°C при 5% CO<sub>2</sub>. Для стимуляции использовали ферменты (коллагеназу, трипсин, диспазу), липополисахарид *E. coli* (LPS), формил-метионил-лейцил-фенилаланин (fMLP) и бета-аланин (β-Ala). После стимуляции экспланты гомогенизировали в 0,5 мл Тризола (TRI-REAGENT). Тотальную РНК выделяли с использованием хлороформа с последующим осаждением изопропанолом и промывкой 75% этанолом. Синтез первой цепи кДНК осуществляли с помощью набора RevertAid First Strant cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific). Экспрессию ИЛ 25, 33 и ТСЛП определили методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием набора ScreenMix-HS (Evrogen). В качестве праймеров использовали следующие олигонуклеотиды (Evrogen):

С С С А G С А А А G А G С А А G А А С С  
и АТССТСТАGСAGСАСАAGСG для ИЛ 25;  
G T C T C C T G C C T C C C T G A G T A  
и GTGGTGCCTGCTCTTCTGAA для ИЛ 33;  
C T G C C T G A A T C A A A C C T C A C A A  
и TGACTGCCCGAAGTGTCAAT для ТСЛП;  
G G T G C T G A G T A T G T C G T G G A  
и TGGAAGAGTGGGAGTTGCTG для GADPH.

Реакцию проводили на приборе DNA Thermal Cycler (Perkin Elmer) Детекцию продуктов осуществляли электрофорезом в 1,5% агарозном геле с добавлением бромистого этидия с использованием M15 100+bp DNA Ladder (SibEnzyme, Lot 41).

**Результаты и обсуждение.** Во всех образцах наблюдали экспрессию контрольного GADPH

гена. В контроле без стимуляции была обнаружена спонтанная экспрессия ИЛ-33, но не ИЛ-25 или ТСЛП. При действии коллагеназы (100 нМ и 1 мкМ) наблюдалась стимуляция продукции ИЛ-33 и ТСЛП. Диспаза (1 мкМ) и трипсин (1 мкМ) стимулировали экспрессию только ТСЛП. ИЛ-25 не регистрировался ни в одной из культур. LPS, агонист Toll-подобного рецептора 4, в концентрации 1 мкг/мл, не индуцировал продукцию ни одного из цитокинов. Индуктор fMLP (1 мкМ) стимулировал экспрессию ИЛ-33 и ТСЛП. β-аланин стимулировал экспрессию только ИЛ-33. Эффект стимуляции прямо зависел от размера экспланта и дозы стимула.

В эксплантах пищевода оценивали продукцию ИЛ-33. Ни один из индукторов не вызывал экспрессии генов тканевых цитокинов в клетках эпителия пищевода. Не наблюдали также спонтанной продукции ИЛ-33.

ИЛ-33 известен как фактор, высвобождаемый из некротических клеток. Очевидно, в эпителиальных клетках трахеи постоянно синтезируется определенное количество ИЛ-33, что подтвердили спонтанной экспрессией гена в контрольных культурах без индукторов. Экспрессия гена ИЛ-33 дополнительно стимулировалась коллагеназой, fMLP и β-аланином, тогда как экспрессию гена ТСЛП стимулировали коллагеназа, трипсин, диспаза и fMLP. Различие в спектре индукторов ИЛ-33 и ТСЛП указывает на сортировку эпителиальными клетками типов сигнала в зависимости от типа индуктора. Экспрессия гена ТСЛП отсутствовала в нестимулированных культурах трахеи, демонстрируя, что данный фактор является индуцируемым. Экспрессию гена ИЛ-25 не выявили, что указывает на различие спектра тканевых цитокинов в зависимости от локализации эпителия. Из всех выбранных индукторов коллагеназа и fMLP могут использоваться для инициации продукции ИЛ 33 и ТСЛП при моделировании аллергии на мышах.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Масюк В. С., Хурцилава О. Г. Педиатрия 2008, 87 (4), 112-115.
2. Palm N. W., Rosenstein R. K., Medzhitov R. Nature 2012, 484, 465-472.
3. Licona-Limon P., Kim L. K., Palm N. W., Flavell R. A. Nature Immunology 2013, 14 (6), 536-542.

## EX VIVO STIMULATION OF PROALLERGIC TISSUE CYTOKINES IN MURINE TRACHEA

Chudakov D. B.

*Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia*

Cytokines produced by epithelial cells in response to a damage or infection are called alarmines such as interleukins (IL) 25, 33 and thymic stromal lymphopoietin (TSLP) and are able to stimulate the production of allergy-associated cytokines IL 4 and 13 by the immune system. The aim of this work was to study various stimuli able to induce IL 25, 33 and TSLP expression in murine trachea. Different proteases, lipopolysaccharide (LPS), N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP) and  $\beta$ -alanine were used to stimulate ex vivo tracheal explants. Gene expression was studied by polymerase chain reaction with reverse transcription. We demonstrated the spontaneous production of IL 33 which was increased by collagenase, fMLP, and  $\beta$ -alanine. Collagenase, trypsin, and fMLP were able to stimulate TSLP gene expression. Expression of IL 25 was found in no samples tested. Thus, the response of epithelial cells differs depending on the type of stimuli. Collagenase and fMLP are the best candidates to induce alarmines IL 33 and TSLP in trachea in a murine model of allergy.

## ВЛИЯНИЕ ПОВЫШЕНИЯ УРОВНЯ ИНТЕРЛЕЙКИНА-1 $\beta$ В РАННЕМ ВОЗРАСТЕ НА ДОФАМИН- И СЕРОТОНИНЕРГИЧЕСКУЮ СИСТЕМУ ГИППОКАМПА ВЗРОСЛЫХ КРЫС

Шварц А. П.<sup>1</sup>, Карпенко М. Н.<sup>2</sup>, Трофимов А. Н.<sup>1</sup>,  
Ищенко А. М.<sup>3</sup>, Зубарева О. Е.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБУН Институт экспериментальной медицины; <sup>2</sup>Санкт-Петербургский государственный политехнический университет Петра Великого; <sup>3</sup>ФГУП Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов Федерального медико-биологического агентства, Санкт-Петербург, Россия

Повышение уровня интерлейкина (ИЛ) –1 $\beta$  в раннем постнатальном периоде приводит к долговременным нарушениям когнитивных функций. Одним из их механизмов может быть изменение функциональной активности моноаминергических систем гиппокампа. В данной работе исследовано содержание дофамина, серотонина и их метаболитов в гиппокампах взрослых крыс, которым вводили ИЛ-1 $\beta$  (1 мкг/кг) ежедневно в/б в течение 3-ей недели жизни. Уровень моноаминов определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии в обычных условиях и при когнитивной нагрузке (выработке условного рефлекса активного избегания). Разнонаправленные изменения выявлены только в отношении серотонинергической системы у обученных и необученных крыс. Необученные животные отличаются более высоким содержанием серотонина; обученные, напротив, более низким его содержанием и более интенсивным метаболизмом.

**Ключевые слова:** интерлейкин-1 $\beta$ , нейроиммунные взаимодействия, ранний постнатальный период, серотонин, дофамин, гиппокамп, обучение.

**Актуальность и цель работы.** Различные виды перинатальной патологии (гипоксия, стрессы и инфекционные заболевания) могут приводить к повышенному риску возникновения аутизма, шизофрении и др. [1]. Общим патогенетическим механизмом данных состояний является высокая продукция в клетках нервной и иммунной систем провоспалитель-



ных цитокинов: интерлейкина (ИЛ)-1 $\beta$ , ИЛ-6 и фактора некроза опухоли  $\alpha$ . Открытые как медиаторы межклеточных взаимодействий в иммунной системе, данные цитокины рассматриваются как основные посредники нейроиммунных взаимодействий. Повышение уровня ИЛ-1 $\beta$  в периоды раннего постнатального онтогенеза может приводить к длительным нарушениям когнитивных функций [2, 3]. Молекулярно-клеточные механизмы этих нарушений практически не исследованы.

**Цель работы** – изучение особенностей функционирования дофамин- и серотонинергической систем гиппокампа крыс, которым вводили ИЛ-1 $\beta$  в течение 3-ей недели жизни, в обычных условиях и при когнитивной нагрузке – выработке условного рефлекса активного избегания (УРАИ).

**Материалы и методы.** Эксперименты выполнены на 41-м самце крыс Вистар, содержащихся в стандартных условиях, с соблюдением принципов гуманности (Директивы Европейского Сообщества № 86/609 ЕС). В эксперименте использованы крысы, которым с 15 по 21 день жизни, 1 раз в день внутривентриально вводили человеческий рекомбинантный ИЛ-1 $\beta$  (Институт особо чистых биопрепаратов, С.-Петербург) в умеренно-пирогенной дозе 1 мкг/кг, либо апирогенный физ. раствор, а также интактные животные (крысята одного помета использовались во всех 3 группах).

В возрасте 3-х месяцев у половины крыс из каждой группы вырабатывали УРАИ. Тренировку проводили в челночной камере из двух одинаковых отсеков с электродным полом на разных уровнях. Через 5 сут после действия условного сигнала (УС) – света – на лапы животного подавали электрокожное раздражение (безусловный сигнал, БС), что заставляло животное перейти в другой отсек. В 1-й день крысам предъявляли 10 сочетаний УС и БС, в последующие 4 дня – по 20. На 5-й день, через 90 минут после последнего обучения (либо в то же время для необученных крыс), животных декапитировали, извлекали и взвешивали гиппокампы. Образцы замораживали и хранили при  $-70$  °С. Содержание дофамина (ДА), 3,4-диоксифенилуксусной и гомованилиновой кислот, серотонина (5-окситриптамина, 5-ОТ) и 5-оксииндолуксусной кислоты (5-ОИУК) определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с электрохимической детекцией.

Статистическую обработку результатов проводили в программах SPSS 16.0. и Statistica 7. Для сравнения содержания моноаминов, их метаболитов и показателей активности метаболизма в гиппокампах обученных и необученных крыс применяли *t*-критерий Стьюдента. Для оценки влияния препаратов отдельно в группах обученных и необученных животных использовали однофакторный дисперсионный анализ. Для попарного сравнения групп с гомогенными дисперсиями (оценивали по тесту Левена) использовали *post hoc* критерий НЗР. Если дисперсии значительно различались, применяли критерий Уэлча и *post hoc* критерий Геймса-Ховела. Для оценки совместного влияния когнитивной нагрузки и вводимых препаратов применяли двухфакторный дисперсионный анализ.

**Результаты.** Введение препаратов в раннем возрасте не сказывалось на содержании дофамина и его метаболитов у крыс без когнитивной нагрузки, однако влияло на уровень серотонина в гиппокампе ( $F=2,85$ ;  $p=0.025$ ). Содержание 5-ОТ в ткани опытных животных было в 2 раза выше, чем у интактных крыс ( $p=0.008$ ).

Влияние когнитивной нагрузки на интактных крыс выразилось в увеличении уровня 5-ОТ, в снижении – 5-ОИУК и значительном (почти в 6 раз) уменьшении соотношения 5-ОИУК/5-ОТ в гиппокампе. Значимых изменений в содержании дофамина и его метаболитов не выявлено.

В условиях когнитивной нагрузки, межгрупповые различия носили более выраженный характер, чем без нее. Влияние введений ИЛ-1 $\beta$  обнаружено в отношении содержания 5-ОТ ( $F=6.40$ ;  $p=0.009$ ) и 5-ОИУК/5-ОТ ( $F=4.24$ ;  $p=0.033$ ), причем отличия от контрольных групп имели иную направленность, чем у крыс без когнитивной нагрузки. В частности, содержание серотонина в гиппокампе опытных животных было значительно ниже, чем у крыс с введением физиологического раствора ( $p=0.02$ ) и интактных животных ( $p=0.004$ ). Уровень метаболизма серотонина, оцененный по отношению метаболит/медиатор, в опытной группе был выше, чем у интактных крыс ( $p=0.011$ ). Разнонаправленный характер изменений между интактными, контрольными и экспериментальными животными в разных экспериментальных условиях, был подтвержден двухфакторным дисперсионным анали-

зом в отношении содержания серотонина ( $F_{2,34}=10.48$ ;  $p=0.0003$ ).

Результаты попарного сравнения групп с помощью t-критерия Стьюдента для групп с разными дисперсиями показали, что в отличие от интактных и контрольных крыс, у которых уровень метаболизма серотонина (5-ОИУК/5-ОТ) снижался при тренировке в тесте УРАИ, у экспериментальных животных подобных изменений не происходило. Контрольные крысы с введением физиологического раствора не отличались от интактных ни по одному из изученных показателей.

Таким образом, повышение уровня ИЛ-1 $\beta$  в раннем возрасте влияет на содержание серотонина в гиппокампе и активность его метабо-

лизма у взрослых животных. Эти изменения носят различный характер в обычных условиях и при когнитивной нагрузке (выработке УРАИ), и могут лежать в основе выявленных ранее нарушений обучения крыс, вызванных введением ИЛ-1 $\beta$  в течение 3-ей недели жизни [2].

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Meyer U., Feldon J., Dammann O. *Pediatr Res* 2011, 69 (5 Pt 2), 26R-33R.
2. Зубарева О. Е., Щербакова К. П., Калемениев С. В., Симбирцев А. С., Клименко В. М. Журн ВНД им. И. П. Павлова 2011, 61 (6), 736-741.
3. Трофимов А. Н., Зубарева О. Е., Симбирцев А. С., Клименко В. М. *Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова* 2012, 98 (6), 782-792.

### THE EFFECT OF INTERLEUKIN-1 $\beta$ ELEVATION DURING EARLY LIFE ON DOPAMINERGIC AND SEROTONERGIC SYSTEMS OF THE ADULT RAT HIPPOCAMPUS

Schwarz A. P.<sup>1</sup>, Karpenko M. N.<sup>2</sup>, Trofimov A. N.<sup>1</sup>,  
Ischenko A. M.<sup>3</sup>, Zubareva O. E.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Federal State Budgetary Scientific Institution "Institute of Experimental Medicine";*

<sup>2</sup>*Peter the Great St. - Petersburg Polytechnic University;* <sup>3</sup>*Research Institute of Highly Pure Biopreparations, St.-Petersburg, Russia*

Elevation of proinflammatory cytokine Interleukin (IL)-1 $\beta$  during early postnatal life leads to long-lasting disruption of cognitive function. Hippocampal dopamine- and serotonergic dysfunctions are believed to be one of the mechanisms of these disruptions. Dopamine, serotonin and its metabolites' level in the hippocampus of adult rats injected with IL-1 $\beta$  (1 $\mu$ g/kg i.p. daily) during the 3rd week of life was measured using HPLC. We have shown the changes in serotonergic but not dopaminergic system. Moreover these changes were opposite in standard conditions and upon cognitive load (active avoidance conditioning). Adult naïve rats treated with IL-1 $\beta$  during the 3rd week had increased serotonin level in hippocampus in comparison with controls. In contrast, in the presence of learning IL-1 $\beta$ -treated animals had decreased serotonin level and increased level of its metabolism measured as serotonin/5-hydroxyindoleacetic acid ratio.

## ИССЛЕДОВАНИЕ ЦИТОКИНОВОГО СПЕКТРА В СЕКРЕТАХ СЛИЗИСТЫХ УРОГЕНЕТАЛЬНОГО ТРАКТА ПРИ ГОНОРЕЕ

Румянцева М. А.<sup>1</sup>, Бахметьев Б. А.<sup>2</sup>, Елькин В. Д.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Краевое государственное автономное учреждение кожновенерологический диспансер;  
<sup>2</sup>Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН; <sup>3</sup>Пермский государственный  
медицинский университет им. академика Е. А. Вагнера, Пермь, Россия

Одним из механизмов, способствующих уходу *Neisseria gonorrhoeae* от иммунного ответа, считается ее способность изменять цитокиновый спектр в слизистых урогенитального тракта. Целью исследования явилась сравнительная оценка локального содержания цитокинов в динамике стандартного лечения пациентов с острой гонореей. В связи с этим проведено двукратное (до и через 10 дней после лечения цефтриаксоном) исследование вагинального (15 женщин) и уретрального секретов (15 мужчин) пациентов с диагнозом «острая неосложненная гонорея нижних отделов мочеполового тракта. При острой гонорее (72 часа от момента инфицирования) и у мужчин и у женщин увеличивался уровень TNF- $\alpha$ . Напротив, концентрации IL-1 $\beta$  и IL-8 были снижены по сравнению со здоровыми добровольцами. Через 10 дней после терапии содержание цитокинов в секретах существенно изменялось. У мужчин снижались концентрации TNF- $\alpha$  и IL-8, но повышалась концентрация IL-1 $\beta$ . У женщин после лечения содержание IL-1 $\beta$ , IL-8 и TNF- $\alpha$  практически не изменилось и осталось сопоставимым с таковым до начала терапии.

*Ключевые слова:* цитокины, вагинальный секрет, уретральный секрет, гонорея.

**Введение.** Инфекция генитального тракта *Neisseria gonorrhoeae* обычно сопровождается интенсивным воспалительным ответом, который характеризуется притоком нейтрофилов. Однако естественная инфекция этим возбудителем не индуцирует состояние специфического защитного иммунитета против реинфицирования [1]. Одним из механизмов способствующих уходу *Neisseria gonorrhoeae* от иммунного ответа считается ее способность изменять цитокиновый спектр в слизистых урогенитального тракта [2]. При экспериментальной гонококковой инфекции у мышей установлено, что *Neisseria gonorrhoeae* избирательно ингибирует Th1 и Th2 клетки, но стимулирует развитие Th17 через индукцию TGF- $\beta$  [1].

**Целью исследования** явилась сравнительная оценка локального содержания цитокинов в динамике стандартного лечения пациентов с острой гонореей.

**Материалы и методы.** Проведено двукратное (до и через 10 дней после лечения цефтриаксоном – 250 мг в/м, однократно) исследование вагинального (15 женщин) и уретрального секретов (15 мужчин) пациентов с диагнозом

«острая неосложненная гонорея нижних отделов мочеполового тракта». С информированного согласия аналогичное исследование было выполнено у здоровых добровольцев (10 женщин и 10 мужчин). Для получения секретов ложкой Фолькмана объемом 0,01 мл брали содержимое задне-боковой стенки влагалища или уретры, помещали в пробирку с 0,39 мл физиологического раствора и после тщательного перемешивания 0,01 мл из этой пробирки наносили на диск фильтровальной бумаги диаметром 6 мм. Определение уровня IL-1 $\beta$ , IL-8, IL-17, INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  в полученных образцах проводили после экстракции секрета из дисков, с помощью твердофазного иммуноферментного анализа согласно инструкции производителя. Статистическая обработка материала выполнена с использованием программы «Statistica».

**Результаты и обсуждение.** У здоровых добровольцев в секретах урогенитального тракта частота обнаружения и концентрация исследованных цитокинов зависела от пола. В уретральных секретах 10 обследованных мужчин не обнаружили IFN- $\gamma$ , IL-17. TNF- $\alpha$  (4,29 пг/мл) зарегистрирован только в одном

образце. Концентрация IL-1 $\beta$  (1395,46 пг/мл), IL-8 (5808,71 пг/мл).

У 10 женщин в вагинальном секрете также не удалось определить IFN- $\gamma$  и IL-17, а TNF- $\alpha$  выявлен только у двух обследованных (10,59 пг/мл). Концентрация IL-1 $\beta$  (1150,85 пг/мл), IL-8 (4485,34 пг/мл).

При острой гонорее (72 часа от момента инфицирования) и у мужчин и у женщин увеличивался уровень TNF- $\alpha$ : 19,63 пг/мл и 12,75 пг/мл соответственно. Напротив, концентрации IL-1 $\beta$  (888,45 пг/мл у мужчин, и 774,98 пг/мл у женщин) и IL-8 (1602,15 пг/мл у мужчин, и 1489,85 пг/мл у женщин) были снижены по сравнению со здоровыми добровольцами. У 4 пациентов мужского пола был определен IFN- $\gamma$  (242,76 пг/мл) и у 1 пациента – IL-17 (17,27 пг/мл), которые у женщин с острым процессом выявить не удалось.

Через 10 дней после терапии содержание цитокинов в секретах существенно изменялось. У мужчин снижались концентрации TNF- $\alpha$  (5,03 пг/мл) и IL-8 (963,64 пг/мл), но повышалась концентрация IL-1 $\beta$  (3088,29 пг/мл).

У женщин после лечения содержание IL-1 $\beta$  (978,74 пг/мл), IL-8 (1749,95 пг/мл) и TNF- $\alpha$

(21,84) практически не изменилось и осталось сопоставимым с таковым до начала терапии.

Таким образом, в динамике лечения гонококковой инфекции цитокиновый спектр уретрального тракта мужчин восстанавливается до контрольного (здоровые добровольцы) уровня быстрее, чем таковой в вагинальном тракте женщин. Хорошо известно, что существуют различия в течении гонококковой инфекции у мужчин и женщин, связанные с особенностями колонизации [3]. Весьма вероятно, что выявленные в настоящей работе различия также могут лежать в основе более частой персистенции *Neisseria gonorrhoeae* и хронического течения рецидивирующей гонококковой инфекции у женщин.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Liu Y, Islam EA, Jarvis GA, Gray-Owen SD, Russell MW. Mucosal Immunol 2012,5:320-331.
2. Ramsey KH, Schneider H, Cross AS, Boslego JW, Hoover DL, Staley TL, et al. J Infect Dis 1995,172:186-191.
3. Edwards JL, Apicella MA. Clin Microbiol Rev 2004,17:965-981.

### ANALYSIS OF CYTOKINE SPECTRUM IN MUCOSAL UROGENITAL TRACT SECRETIONS IN GONORRHEA

Rumyantseva M.A.<sup>1</sup>, Bachmetyev B.A.<sup>2</sup>, Elkin V.D.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Regional Dermatovenerology Clinic; <sup>2</sup>Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, UB RAS;

<sup>3</sup>Acad. E.A Vagner Perm State Medical University, Perm, Russia

Results of proinflammatory cytokine concentrations in mucosal urogenital tract secretions from men and women are presented. Gender differences were revealed in IL-1 $\beta$ , IL-8 and TNF- $\alpha$  concentrations, as well as the tendency of their changes in the dynamics of therapy. Possible reasons for such bidirectional trend in cytokine level from male and female secretions and diagnostic significance of their detection in gonorrhoea are discussed.

*Key words:* cytokine, vaginal mucosal secret, urethral mucosal secret, gonorrhoea.

**Раздел 3**  
**ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ**  
**СИСТЕМЫ**

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ МЕТОДОВ В ДИАГНОСТИКЕ ДОКЛИНИЧЕСКОГО РЕЦИДИВА ИНВАЗИВНЫХ ФОРМ РАКА ШЕЙКИ МАТКИ

Батурина И. Л., Абрамовских О. С., Телешева Л. Ф., Жаров А. В.,  
Никушкина К. В., Савельева А. А.

ГБОУ ВПО Южно-Уральский государственный медицинский университет  
Минздрава России, Челябинск, Россия

Рак шейки матки (РШМ) относится к социально значимым заболеваниям, поэтому возможность диагностики доклинических рецидивов плоскоклеточного РШМ очень важна, и в значительной мере зависит от сроков их выявления. В нашем исследовании было установлено, что определение SCCA у пациенток с МРШМ должно проводиться в совокупности с уровнем IFN $\alpha$  и IFN $\gamma$  до лечения, через 6 и 12 месяцев после проведенного лечения. Такой подход позволит врачам еще на этапе до лечения предположить более агрессивное течение РШМ и выбрать адекватную тактику лечения таких пациенток.

*Ключевые слова:* рак шейки матки, рецидив, SCCA, IFN $\alpha$  и IFN $\gamma$  цервикальной слизи.

**Актуальность.** Рак шейки матки (РШМ) относится к социально значимым заболеваниям. Доля запущенных случаев, среди первично выявленных, остается высокой, составляя более трети (37,9%) и не имеет тенденции к снижению. В связи с этим, количество больных, получающих комбинированное и комплексное лечение, также остается стабильно высоким [1]. Такие пациентки составляют группу риска по развитию рецидива заболевания, а возможность эффективного лечения рецидивов плоскоклеточного РШМ в значительной мере зависит от сроков их выявления. Многие исследователи описывают множество маркеров, влияющих на опухолевую прогрессию, но результаты их использования для прогноза течения неопластического процесса остаются разнонаправленными и разрозненными. В последние годы в литературе появились данные, посвященные биологическим свойствам опухоль-ассоциированного маркера SCCA (squamous cell carcinoma antigen), его использованию в оценке степени распространенности опухоли и эффективности проводимой терапии [2]. До сих пор не ясной остается роль онкомаркера SCCA в иммунопатогенезе РШМ, а именно его взаимосвязи с цитокиновыми (интерфероновыми) каскадами.

**Цель:** изучение взаимосвязи концентрации онкомаркера SCCA сыворотки крови и уровней IFN $\alpha$  и IFN $\gamma$  цервикальной слизи у пациенток с местнораспространенными формами рака шейки матки (МРШМ)

**Материалы и методы.** Проведено комплексное обследование 80 женщин с МРШМ IIa, IIb, IIIa, IIIb стадии в возрасте от 18 до 55 лет. Для оценки уровня содержания SCCA в сыворотке крови использовали тест – систему Can.Ag.<sup>®</sup> EIA-Fudjirebio Diagnostics inc., Sweden. Содержание уровня интерферонов (IFN $\alpha$ , IFN $\gamma$ ) определяли методом твердофазного ИФА с использованием тест-системы ООО «Цитокин», Санкт-Петербург. Все вышеперечисленные исследования проводились пациенткам с МРШМ до лечения, через 6 и 12 месяцев после проведенной терапии. Определение уровня SCCA в сыворотке крови и интерферонов (IFN $\alpha$ , IFN $\gamma$ ) оценивали ретроспективно в зависимости от динамики течения данного заболевания в двух группах больных: группу А составили 40 пациенток МРШМ с положительной динамикой течения процесса, в которую вошли подгруппа А1 – до лечения, подгруппа А2 – через 6 месяцев после лечения и подгруппа А3 – через 12 месяцев после лечения; группу В – 40 больных

МРШМ с отрицательной динамикой течения опухолевого процесса, которую составили 3 подгруппы – В1, В2 и В3, соответственно. Полученные результаты исследований были подвергнуты статистической обработке с использованием пакета прикладных программ “Statistica for windows 6.0”

**Результаты.** При обследовании пациенток было установлено, что исходно повышенный уровень SCCA наблюдался у всех пациенток до лечения по сравнению с группой контроля, причем достоверных различий уровней SCCA между данными подгруппами установлено не было. Через 6 месяцев после проведенной терапии данный показатель в обеих подгруппах не изменялся от его исходного уровня до лечения. Достоверное снижение уровней SCCA отмечалось только через 12 месяцев после лечения в подгруппе пациенток с МРШМ с положительной динамикой течения по сравнению с таковым как до лечения, так и с уровнем SCCA в подгруппе пациенток с отрицательной динамикой течения через 6 и 12 месяцев после лечения. У больных МРШМ с отрицательным терапевтическим эффектом через 12 месяцев после лечения уровень SCCA не претерпел существенных изменений и был близок к значению данного показателя до лечения. Анализ уровней интерферонов цервикальной слизи показал снижение IFN $\alpha$  на всех сроках наблюдения в группе пациенток с МРШМ с положительной динамикой течения заболевания, тогда как в группе с отрицательным терапевтическим эффектом отмечалось прогрессирующее снижение изучаемого интерферона. При оценке уровня IFN- $\gamma$  цервикальной слизи у пациенток с положительной динамикой заболевания наблюдалось его повышение как через 6, так и через 12 месяцев после проведенного лечения. Тогда как в группе с отрицательным терапевтическим эффектом регистрировалось прогрессирующее снижение IFN $\gamma$ , более выраженное через 12 месяцев после лечения. Межгрупповой сравнительный анализ показал повышение уровня IFN $\alpha$  и снижение IFN $\gamma$  на всех сроках наблюдения в группе пациенток МРШМ и отрицательной динамикой по сравнению с таковыми у больных с положительным терапевтическим эффектом от лечения. Следует отметить, что в группе пациенток с МРШМ и отрицательной динамикой течения заболевания отме-

чался исходно повышенный уровень IFN $\alpha$  и IFN $\gamma$  цервикальной слизи. При изучении корреляционных взаимосвязей концентрации SCCA с уровнями интерферонов цервикальной слизи установлено, что в группе пациенток МРШМ с положительной динамикой течения опухолевого процесса до лечения таковые отсутствовали. Через 6 месяцев после проведенного лечения определялась взаимосвязь SCCA с IFN $\gamma$  слизи ( $r=0,54$ ), которая отсутствовала через 12 месяцев после лечения. В подгруппах пациенток МРШМ с отрицательной динамикой регистрировалась связь SCCA с IFN $\alpha$  цервикальной слизи, установленная до лечения ( $r=0,45$ ) и усиливающаяся через 6 ( $r=0,80$ ) и 12 месяцев после лечения ( $r=0,95$ ).

**Выводы.** Полученные результаты данного исследования позволили установить, что онкомаркер SCCA является иммунологически зависимым маркером и одинаково повышенный уровень SCCA до лечения или отсутствие его колебания через 6 месяцев после специального лечения не всегда свидетельствует о динамике течения опухолевого процесса [2]. У пациенток с отрицательной динамикой течения опухолевого заболевания уже на этапе до лечения при одинаково повышенном уровне SCCA уровни IFN $\alpha$  и IFN $\gamma$  резко повышаются, что является неблагоприятным прогностическим признаком и может служить основанием для выбора тактики более агрессивного противоопухолевого лечения. В связи с чем, определение SCCA у пациенток с МРШМ должно проводиться в совокупности с уровнем IFN $\alpha$  и IFN $\gamma$  до лечения, через 6 и 12 месяцев после проведенного лечения. Такой подход позволит врачам еще на этапе до лечения предположить более агрессивное течение РШМ и выбрать адекватную тактику лечения таких пациенток, а также, на доклинической стадии заподозрить начало рецидива заболевания и назначить расширенное обследование.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Сергеева Н. С. Серологические опухолевые маркеры / Н. С. Сергеева, Н. В. Маршутина // Онкология. Клинические рекомендации. 2-е изд., исправ. и доп. М.: Издательская группа “ГЭОТАР Медиа”, 2009. С. 83-134.
2. Батурина И. Л., Зотова М. А., Орнер И. Ю. и др. // Инфекция и иммунитет. – Т. 4., № 2. – 2014. – С. 143-147.

## USING THE IMMUNOLOGICAL METHODS IN DIAGNOSTICS OF PRECLINICAL RECURRENCE OF INVASIVE CERVICAL CANCER

Baturina I. L., Abramovskih O. S., Telesheva L. V., Zharov A. V.,  
Nikushkina K. V., Savelieva A. A.

*Medical University of South Ural, Ministry of Health of Russia, Chelyabinsk, Russia*

Cervix cancer (CC) refers to the socially significant diseases, so the possibility of preclinical diagnosis of recurrence of squamous cervical cancer is very important and is largely dependent on the timing of their detection. In our study, it was found that the determination of SCCA invasive CC in certain patients can be carried out in combination with IFN $\alpha$ , and IFN $\gamma$  levels at a baseline, 6 and 12 months after treatment. Such an approach would allow physicians at the pre-treatment stage to assume a more aggressive therapy of cervical cancer, and select appropriate counseling and treatment of such patients.

*Keywords:* cervical cancer, recurrence, SCCA, IFN $\alpha$  and IFN $\gamma$  cervical mucus.

---

---

## ЭФФЕКТИВНОСТЬ СОВРЕМЕННЫХ КРИТЕРИЕВ ДИАГНОСТИКИ И РАЦИОНАЛЬНОЙ АНТИБИОТИКОТЕРАПИИ ВЕНТИЛЯТОР-АССОЦИИРОВАННЫХ ПНЕВМОНИЙ У НОВОРОЖДЁННЫХ

Алиева А. И.<sup>2</sup>, Омарова С. М.<sup>2</sup>, Свитич О. А.<sup>1</sup>,  
Абсерханова Д. У.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ФГБНУ НИИ ВС им. И. И. Мечникова, Москва; <sup>2</sup>Дагестанская Государственная Медицинская Академия, Махачкала, Россия

Разработка различных критериев диагностики и лечения заболеваний органов дыхания у новорожденных остается актуальной проблемой педиатрии в условиях постоянного совершенствования медицинских технологий, отмечаемого в настоящее время. Среди заболеваний органов дыхания в периоде новорожденности пневмония занимает особое место в связи с большой частотой, тяжестью течения, возможностью осложнений и неблагоприятных исходов.

*Ключевые слова:* новорожденные, пневмонии, диагностика, этиология, антибиотикорезистентность.

Заболевания органов дыхания широко распространены среди детского населения и имеют большой удельный вес в структуре заболеваемости. Довольно частой формой поражения органов дыхания у детей являются пневмонии [1]. По результатам российского исследования, у недоношенных, находившихся на ИВЛ, заболеваемость вентилятор-ассоциированной пневмонией (ВАП) составила 45,8%, а у детей, находившихся в отделениях выхаживания, – 19,2%, причем показано, что продолжительность ИВЛ увеличивает риск развития пневмонии [3, 5]. Дальнейшая разработка различных аспектов

диагностики и методов лечения заболеваний органов дыхания у новорожденных остается важной и актуальной в условиях постоянного совершенствования медицинских технологий, отмечаемого в настоящее время [4]. Несмотря на успехи в разработке и внедрении новых антибактериальных препаратов, проблема успешного лечения пневмонии остается нерешенной. На сегодняшний день общеизвестно, что основу терапии пневмоний у детей составляют антибиотики, выбор которых огромен [2].

**Цель работы:** проведение микробиологического и иммунологического мониторинга



новорожденных, с обоснованием принципов комплексной антибактериальной терапии.

**Материалы и методы.** Исследования были проведены в ОРИТ родильного дома Республиканской клинической больницы г. Махачкала с 2012 по 2014 гг. При проведении бактериологического исследования клинического материала (кровь, трахеобронхиальный аспират) от новорожденных детей (173) с подозрением на пневмонию было изучено 936 клинических образцов, выделено и идентифицировано до вида (рода) 587 штаммов микроорганизмов. Все выделенные и идентифицированные культуры протестированы на чувствительность к антибактериальным препаратам (МУК 4.2.1890–04), а также изучены некоторые биологические свойства для характеристики изолированных культур.

Для исследования экспрессии генов врожденного иммунитета TLR2, TLR4, HBD-1, HBD-2, TNF $\alpha$  и NF- $\kappa$ B из клинического материала (эпителиальные клетки верхних дыхательных путей) проводили выделение РНК с использованием набора «РИБОсорб» (ИЛС, РФ). ПЦР проводили в амплификаторе для ПЦР-РВ ДТ-96 (ДНК-технология, РФ). Определение уровня экспрессии генов проводилось относительно экспрессии гена  $\beta$ -актина.

**Результаты.** При бактериологическом исследовании у большинства новорожденных были выделены грамотрицательные микроорганизмы (93%), среди которых преобладали энтеробактерии (79%). Энтеробактерии чаще всего были представлены *Klebsiella pneumoniae* (33%), *Escherichia coli* (24%) и *Pseudomonas aeruginosa* (22%). Грампозитивные возбудители ВАП были представлены коагулазоотрицательными стафилококками, среди которых преобладали *Staphylococcus epidermidis*, обладающие гемолитическими свойствами (26%). При затяжном течении ВАП основным возбудителем являлась *Stenotrophomonas maltophilia*.

Становятся значимыми атипичные возбудители (*Mycoplasmae spp.*, *Chlamydiae spp.*), которые изменяют традиционные представления об эпидемиологии и клинической картине пневмоний. У 9–20% больных пневмонией наблюдалось нарастание титров антител к микоплазменной инфекции, а у 15% больных обнаружены микоплазмы. Это дало основание утверждать, что у 15–20% детей острая пневмония обусловлена микоплазмами. Причем

с возрастом значение микоплазменной инфекции в этиологии острых пневмоний возрастает. У 25% больных обнаруживаются серологические признаки острой хламидийной инфекции и практически с одинаковой частотой во всех возрастных группах.

Иммунологические показатели (распознающие структуры – TLR2, TLR4, дефенсины HBD-1, HBD-2, провоспалительный цитокин TNF $\alpha$  и фактор транскрипции NF- $\kappa$ B) у новорожденных с внутриутробным инфицированием и с пневмонией изменяются неоднозначно. Выявлена тенденция к увеличению экспрессии генов TLR2, TLR4 и увеличению экспрессии генов TNF $\alpha$  и NF- $\kappa$ B. Данные изменения коррелируют с инфекционным возбудителем, следовательно, можно предположить, что возбудитель за счет действия факторов патогенности непосредственно влияет на показатели врожденного иммунитета.

С целью определения тактики этиотропной антибактериальной терапии, был проанализирован уровень резистентности к антибактериальным препаратам – 103 микроорганизмов, выделенных из ТБА новорожденных с диагнозом «пневмония».

Изначально неадекватная терапия тяжелой инфекции, вне зависимости от ее локализации и типа возбудителя, увеличивает риск летального исхода. Это убеждает в целесообразности проведения адекватной эмпирической антибактериальной терапии, базирующейся на локальных данных о структуре и чувствительности циркулирующих в родильном стационаре возбудителей.

Выделенные штаммы *K. pneumoniae* проявляли резистентность к большинству антибиотиков и сохраняли 100% чувствительность к имипенему и меропенему. Высокую резистентность к антибиотикам также проявляли штаммы некоторых видов энтеробактерий. Среди выделенных штаммов *P. aeruginosa*, большинство были устойчивыми к 11 из 14 исследуемых антибиотиков. Обращает на себя внимание высокий уровень резистентности к ампициллину (98%) и цефуроксиму (88%), цефазолину (81%), карбенициллину (43%), цефомандолу (82%) соответственно. Большинство штаммов *S. epidermidis* проявляли резистентность к 14 из 20 исследуемых антибиотиков, сохраняя чувствительность к рифампицину, ванкомицину, линкомицину и амоксициллину.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Внутриутробная пневмония (критерии диагностики и стандарты лечения): метод, рекомендации / А. Г. Антонов, Е. Н. Байбарина, Н. И. Бубнова и др. – М., 1997. – 20 с.
2. Геппе Н. А., Волков И. К. // Пульмонология. 2007. – № 4. – С. 56.
3. Дударева М. В. // V Росс, конгресс «Педиатрическая анестезиология и интенсивная терапия». Москва, 2009. – С. 103.
4. Aly H., Badawy M., El-Kholy A. et al. // Pediatrics. 2008. Vol.122, № 4. – P.770-774.
5. Foglia E., Meier M. D., Elward A. // Clin Microbiol Rev. – 2007. Vol. 20, № 3. – P. 409-425.

**THE EFFECTIVENESS OF CURRENT DIAGNOSTIC CRITERIA  
AND RATIONAL ANTIBIOTIC THERAPY OF VENTILATOR-ASSOCIATED  
PNEUMONIA IN NEWBORNS**

**Alieva A.I.<sup>2</sup>, Omarova S.M.<sup>2</sup>, Svitich O.A.<sup>1</sup>, Abserhanova D.U.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>FGBU «NII VS im. I.I. Mechnikov» RAMN, Moscow; <sup>2</sup>Dagestan State Medical Academy, Makhachkala, Russia

Development of different criteria for the diagnostics and treatment of respiratory diseases in neonates remains a burning issue of Pediatrics in continuous improvement of medical technologies at present. Among the respiratory diseases in the newborns pneumonia occupies a special place in connection with great frequency, severity of the progression of disease, the possibility of complications and adverse outcomes.

*Key words:* newborn, pneumonia, diagnosis, etiology, resistance to antibiotics.

**РЕШЕНИЕ ТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРОБЛЕМ ПРИ  
КОНСТРУИРОВАНИИ МОДЕЛЬНОЙ ТЕСТ-СИСТЕМЫ  
ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ СИФИЛИСА НА ОСНОВЕ  
КАРДИОЛИПИНОВОГО АНТИГЕНА И УГЛЕРОДНОГО  
ДИАГНОСТИКУМА**

**Бочкова М. С.<sup>1</sup>, Храмцов П. В.<sup>1,2</sup>, Тимганова В. П.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>ФГБУН Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН; <sup>2</sup>ФГБОУ ВПО Пермский национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

В ходе исследований были подобраны оптимальные условия для синтеза иммуносорбента на основе эмульсии кардиолипидного антигена (Микроген, Россия). Показано, что наибольшая чувствительность наблюдалась при сорбции цельного антигена на полистирольную подложку, в условиях 60 минутной инкубации с серопозитивной сывороткой в разведении 1/2. Применение неионогенного детергента-Твина-20 в концентрации 0,01% позволило эффективно справиться с неспецифическими взаимодействиями и не повлиять на сорбцию кардиолипидного антигена.

*Ключевые слова:* диагностика сифилиса; кардиолипидный антиген; дот-анализ; углеродный диагностикум.

Массовое распространение, высокая заболеваемость и существенная опасность сифилиса для здоровья человека способствуют разработке и постоянному совершенствованию способов его диагностики. Проблема обнару-

жения сифилиса на ранних этапах заболевания становится с каждым годом все более острой вследствие того, что в контингент заболевших все чаще попадают подростки [2]. Описанные особенности обуславливают необходимость

разработки дешевых, надежных, оперативных методов диагностики для идентификации сифилиса на ранних стадиях заболевания и применения адекватных терапевтических мер, с возможностью оперативно контролировать их эффективность.

В РФ для скрининговых реакций применяются серологические методы анализа. Основной метод анализа, используемый в России – это реакция микропреципитации, которая относится к нетрепонемным. В этом тесте определяются антитела класса IgG и IgM к фосфолипидам, липопротеинам, высвобождаемые из поврежденных клеток человека, вследствие сифилитической инфекции и липидам, входящим в состав мембраны бледной трепонемы. Ложноотрицательные результаты обуславливают риск распространения заболевания, препятствуют своевременной изоляции и лечению больного. Необходимость визуальной регистрации реакции увеличивает субъективность оценки результатов, и невозможность сохранения анализа для последующего динамического сравнения являются недостатками этой системы.

На сегодняшний день существует проблема получения иммуносорбентов на основе липидных антигенов, в частности, кардиолипина, поскольку, в отличие от стандартных белковых антилигандов, для липидов необходимы другие условия сорбции и проведения реакции [7]. Обязательное использование неионогенных детергентов, таких как Твин-20, препятствует гидрофобному связыванию молекул с поверхностью твердой фазы, тем самым способствуя удалению липида с подложки [5]. Замена детергента белковыми блокаторами [6], используемыми в высоких концентрациях 5-10%, увеличение времени блокирования с 1 ч до 12-24 ч [7], значительно повышают стоимость анализа. Кроме того, страдают чувствительность и воспроизводимость реакции.

В настоящей работе мы предприняли попытку решить проблему синтеза иммуносорбента на основе кардиолипинового антигена, который должен стать основой для эффективного теста на сифилис.

Целью работы являлось решение технологических проблем при конструировании модельной дот-аналитической тест-системы по определению антител к кардиолипиновому антигену и ее апробация с сыворотками больных сифилисом с детекцией углеродным диалектиком.

Диагностический реагент на основе наночастиц углерода с функционализированной поверхностью хорошо зарекомендовал себя в описанных системах определения различных лигандов: от антител к антигенным детерминантам ВИЧ-1,2 и возбудителей инфекционных заболеваний до бактериальных токсинов и гормонов репродуктивной сферы человека [1,4].

**Материалы и методы. Подбор оптимальной концентрации антилигандов для сенсibilизации твердой непористой фазы.** В качестве основы твердофазного реагента использовали плоское дно лунок планшета, предназначенного для серийных разведений, изготовленного из белого полистирола фирмы Linbro (США). Синтезировали два вида иммуносорбентов: на основе кардиолипинового антигена (ИС-1) и на основе эмульсии кардиолипинового антигена (ИС-2).

В одном случае на дно лунок сорбировали кардиолипиновый антиген (Микроген, Россия), дотами из капель по 1 мкл в концентрациях: 1/2, 1/4, 1/8 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256 в смеси 45% спирта и забуференного фосфатами физиологического раствора с азидом натрия (ЗФР). В другом случае сорбировали эмульсию кардиолипинового антигена для микрореакции (Микроген, Россия), приготовленную по инструкции производителя, дотами из капель по 3,5 мкл в концентрациях: 1/1, 1/2, 1/4, 1/8 в ЗФР. В качестве внутреннего отрицательного контроля на дно одной из лунок сорбировали бычий сывороточный альбумин (БСА) в концентрации 0,1 мг/мл в ЗФР. Затем планшеты выдерживали при комнатной температуре 30 минут. После этого удаляли капли с поверхности лунок с помощью водоструйного насоса и промывали лунки. Промывку ИС-1 осуществляли ЗФР без использования неионогенного детергента Твин-20. Для блокирования неспецифических сайтов связывания использовали препараты, содержащие белки: 2% БСА, казеин, сухое обезжиренное молоко, гидролизат казеина. Время блокирования составляло 60 минут.

ИС-2 промывали ЗФР с 0,1% Твина-20 (ЗФРТ). Белковые блокаторы в данном случае не использовали. В лунки вносили по 150 мкл сыворотки крови содержащей и не содержащей антитела к *Treponema pallidum*, наличие или отсутствие которых было подтверждено при помощи микрореакции преципитации (РМП). Инкубацию с сыворотками проводили

в вариантах 30-ти и 60-ти минутной экспозиции. Использовали как цельные, так и разведенные в ЗФРТ 1/2 сыворотки. По окончании процедуры осуществляли 3-х кратную промывку лунок ЗФРТ. Детекцию проводили при помощи наноразмерных частиц углерода, ковалентно функционализированных G белком стрептококка [3], в течение 30 минут. После инкубации диагностикум удаляли, а лунки промывали ЗФРТ. Регистрацию результатов производили по наличию черного окрашивания в зоне сорбции антигена.

**Результаты.** Наибольшая чувствительность детекции при одновременном отсутствии неспецифических реакций была получена при нанесении на твердую фазу кардиолипинового антигена в разведении 1/16. В условиях сенсibilизации твердой фазы эмульсией кардиолипинового антигена оптимальные результаты получили при иммобилизации ее без разведения. При подборе блокатора для ИС-1 использовали казеин, обезжиренное сухое молоко и гидролизат казеина, однако при этом наблюдали снижение чувствительности анализа. Наибольшая разница между специфическим и фоновым сигналом была достигнута при применении БСА. Для ИС-2 добавление неионогенного детергента Твина-20 во все рабочие растворы позволяло эффективно устранять фоновый сигнал.

В дальнейшем сконструированные иммуносорбенты тестировали при помощи серопозитивных и серонегативных сывороток крови. Наибольшая чувствительность с использованием ИС-1 наблюдалась в условиях инкубации с цельной сывороткой в течение 60 минут. Высокая чувствительность при использовании ИС-2 не изменялась даже в условиях ин-

кубации с сывороткой в разведении 1/2 при одновременном отсутствии неспецифических реакций.

Таким образом, для конструирования нетрепонемного теста, с привлекательными аналитическими характеристиками, отличающегося высокой чувствительностью и специфичностью, наиболее перспективным из антилигандов оказалась эмульсия кардиолипинового антигена. Использование последней позволяет применять растворы детергентов, решающие проблемы тестов на сифилис, описанные в литературе. Применение твина-20 упрощает и удешевляет технологию производства тест-системы, предоставляя возможность отказаться от применения концентрированных растворов белковых блокаторов, значительно снижать уровень фонового сигнала, обеспечивая большую наглядность, надежность и воспроизводимость результатов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Андрюков Б. Г., Тимченко Н. Ф., Раев М. Б. // Вестник российской военно-медицинской академии. 2012. Т. 4. С. 148-151.
2. Болдина Т. В., Решетникова Т. Б. // Медицина и образование в Сибири. 2013. № 4. С. 16.
3. Раев М. Б. Нанобиотехнологии в неинструментальной иммуноаналитике. Екатеринбург: УрО РАН. 2012. 140 с.
4. Раев М. Б. // Клиническая лабораторная диагностика. 2008. № 2. С. 45-48.
5. Antonio R. Cabral, Javier Cabiedes, Donato Alazcon-Segovia // Journal of Immunological Methods. 1994. V. 175. P. 107-104.
6. David C. Kilpatrick // British Journal of Haematology. 1998. V. 100. P. 52-57.
7. Huang Q, Lan X, Tong T, et al. // Journal of Clinical Microbiology. 1996. V. 34 (8). P. 2011-2013.

### RESOLVING THE TECHNOLOGICAL PROBLEMS IN CONSTRUCTING THE MODEL TEST-SYSTEM TO IMPLEMENT THE SYPHILIS DIAGNOSTICS USING CARDIOLIPIN ANTIGEN AND CARBON DIAGNOSTICUM

Bochkova M. S.<sup>1</sup>, Khramtsov P. V.<sup>1,2</sup>, Timganova V. P.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>FSBSI Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms UB RAS;

<sup>2</sup>FSBEI HPE Perm State National Research University, Perm, Russia

Optimal conditions for immunosorbent synthesis based on cardiolipin antigen emulsion (Microgen, Russia) were selected during the investigation. It was demonstrated that highest sensitivity was observed with whole antigen sorption on polystyrene support at 60-min incubation with seropositive serum in 1/2 dilution. Using the non-ionogenic detergent Tween-20 in 0,01% concentration allowed effectively coping with the non-specific interactions and evading the effect on cardiolipin antigen sorption.

## АФФИННОСТЬ АНТИГЕН-СВЯЗЫВАЮЩЕГО УЧАСТКА МИМЕТИКА АНТИТЕЛА, ПОЛУЧЕННОГО В КАРКАСЕ ДОМЕНА ФИБРОНЕКТИНА

Бровман Г. В.<sup>1</sup>, Петровская Л. Е.<sup>1</sup>, Ягудин Т. А.<sup>2</sup>,  
Матушевская Е. В.<sup>3</sup>, Свирщевская Е. В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина  
и Ю. А. Овчинникова РАН; <sup>2</sup>Институт биохимии имени А. Н. Баха РАН;

<sup>3</sup>ФГОУ ДПО ИПК ФМБА, Москва, Россия

При разработке подходов к получению миметиков терапевтических антител в каркасе структурно похожих, но дешевых в производстве белков, необходимо сохранить высокую аффинность рекомбинантных производных антител. В данной работе в бактериях *E. coli* получена панель миметиков антитела мыши к IgG4 антителу человека в каркасе домена фибронектина человека. Методом конкурентного анализа показано, что для сохранения высокой аффинности связывания миметика с мишенью требуется клонирование, как минимум, двух вариабельных участков антитела с различных цепей, что обеспечивает пространственное связывание. Показано, что клонирование 4 вариабельных участков, по два с тяжелой и легкой цепей антитела, является достаточным для высокоаффинного связывания миметика с IgG4 человека.

*Ключевые слова:* каркасные белки, антитела, гипервариабельные участки.

**Актуальность.** При разработке подходов к получению миметиков терапевтических антител в каркасе структурно похожих, но дешевых в производстве белков, необходимо сохранить высокую аффинность рекомбинантных производных антител. Ранее мы получили миметик антитела к IgG4 антителу человека, что может иметь практическое значение для лечения пузырчатки и других аутоиммунных буллезных дерматозов, при которых IgG4 антитела являются патогенными [1]. Аналогичные миметики могут использоваться и для лечения других заболеваний, например, аллергии [2]. Нами были получены конструкции, содержащие разное количество петель гипервариабельных участков (CDRs) IgG1 мыши 5C7, специфичного к IgG4 человека [3].

**Целью данной работы** было сравнение аффинности связывания конструкций, содержащих по 2 петли с тяжелой и легкой цепи; димер, содержащий все 4 петли, а также полноразмерный Fab фрагмент антитела 5C7.

**Материалы и методы.** Белки, содержащие по 2 участка CDRs легкой цепи L1-L3, тяжелой цепи H2-H3, а также димер (L1-L3-H2-H3), получены клонированием в домен фибронектина

человека 10Fn3 в бактериях *E. coli* [1]. Fab фрагмент был получен в дрожжах *Saccharomyces cerevisiae* [1]. Полноразмерное антитело 5C7 очищено из асцитной жидкости.

Для анализа связывания использовали клетки линии кератиноцитов человека HaCaT, которые выращивали на покровных стеклах. К монослою живых клеток вносили сыворотку больных пузырчаткой, содержащую антитела IgG4, специфичные к десмоглеину 3, аутоантигену пузырчатки. После инкубации с антителами больных клетки фиксировали и использовали для анализа связывания миметиков с IgG4. Аффинность связывания оценивали методом конкуренции по сравнению с 5C7 антителом. Конкурент вносили на 1 час, затем добавляли миметики и инкубировали ночь при 4°C. Связанные антитела проявляли вторичными антителами к IgG1 мыши, мечеными Alexa555. Фрагменты определяли с помощью антител к фибронектину человека. После отмывки клетки фиксировали, заливали полимеризующей средой и анализировали с помощью конфокальной микроскопии. В контроле использовали антитела к десмоглеину 3 человека, IgG4 человека и исходные антитела 5C7.

**Результаты и обсуждение.** Инкубация клеток NaCaT с сывороткой больных пузырчаткой давала специфическую мембранную локализацию антител IgG4, ко-локализирующуюся с десмосомами. Инкубация антитела 5C7, а также Fab фрагмента данного антитела также давала аналогичную специфическую картину. Миметики, содержащие по 2 фрагмента CDRs тяжелой и легкой цепей, не связывались с клетками, что показывает низкую аффинность таких миметиков. Димер 4 петель связывался с клетками и ко-локализовался с десмосомами.

При конкурентном ингибировании было показано, что как Fab фрагмент, содержащий 6 петель антитела 5C7, так и димер, содержащий 4 петли антитела 5C7, снижали связывание полноразмерного антитела дозозависимым способом. Аффинность связывания димера была на порядок ниже аффинности связывания Fab, что требовало большего ко-

личества димера для равной конкуренции. Таким образом, для эффективного связывания миметиков антитела требуется клонирование как минимум 2 петель с разных цепей иммуноглобулина. При клонировании 4 петель эффективность связывания может быть достигнута за счет увеличения концентрации миметика, что не является проблемой при получении бактериальных белков, в отличие от рекомбинантных полноразмерных антител, получаемых в клетках млекопитающих, и Fab фрагментов, получаемых в более сложных дрожжевых культурах.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Amagai M., Stanley J. R. *J Invest Dermatol* 2012, 132 (3 Pt 2), 776-84.
2. Lee J. *Asia Pac Allergy* 2014, 4 (2), 126-8.
3. Бровман Г.В., Петровская Л.Е., Ягудин Т.А., и др. *Российский иммунологический журнал* 2014, 8 (17), 516-518.

### AFFINITY OF ANTIGEN BINDING SITE OF ANTIBODY MIMETICS DEVELOPED IN FIBRONECTIN SCAFFOLD

**Brovman G. V.<sup>1</sup>, Petrovskaya L. E.<sup>1</sup>, Yagudin T. A.<sup>2</sup>, Matushevskaya E. V.<sup>3</sup>, Svirshchevskaya E. V.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS;* <sup>2</sup>*Bakh Institute of Biochemistry RAS;*

<sup>3</sup>*Institute of Post-Diploma Medical Education, Moscow, Russia*

During the development of therapeutic antibody scaffolds, which permits the production of cheap analogues, high affinity of antibody mimetics is essential. A panel of antibody mimetics, specific to human IgG4, was developed in human fibronectin scaffold and expressed in *E. coli*. Using a competition analysis it was demonstrated that high affinity of antibody mimetic can be achieved only after cloning of at least two complementarity determining regions (CDRs) of antibody located in different chains facilitating the spatial binding. We demonstrated that cloning of four CDRs, using two from heavy and light chains of antibody, was sufficient for high affinity binding with human IgG4.

## ДИНАМИКА ИММУНОЦИТОХИМИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ РЕМОДЕЛИРОВАНИЯ НЕРВНОЙ ТКАНИ У БОЛЬНЫХ С КОНТУЗИОННЫМИ ОЧАГАМИ И ВНУТРИЧЕРЕПНЫМИ ГЕМАТОМАМИ МАЛОГО ОБЪЕМА

Выгодчикова Г. Ю.<sup>1</sup>, Ульянов В. Ю.<sup>2</sup>, Чехонацкий А. А.<sup>1</sup>,  
Котов С. Н.<sup>1</sup>, Чехонацкий В. А.<sup>1</sup>, Конюченко Е. А.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ГБОУ ВПО «Саратовский ГМУ им. В. И. Разумовского» Минздрава России;

<sup>2</sup>ФГБУ «СарНИИТО» Минздрава России, Саратов, Россия

В сыворотке крови 45 больных с контузионными очагами и внутричерепными гематомами малого объема методом иммуноферментного анализа изучено содержание нейроспецифических белков. Установлено, что ремоделирование ткани головного мозга в посттравматическом периоде характеризуется динамическими изменениями содержания общего белка S-100 ( $\alpha\beta + \beta\beta$ ), основного белка миелина, нейрон-специфической енолазы и глиального фибриллярного кислого протеина.

*Ключевые слова:* нервная ткань, контузионные очаги, внутричерепные гематомы, ремоделирование.

Актуальной проблемой нейрохирургии являются контузионные очаги и внутричерепные гематомы малого объема (КО и ВЧГМО), так как подобные повреждения мозга могут быть своевременно не диагностированы и проявляются уже в виде осложнений и последствий «сотрясения головного мозга» [1]. В структуре внутричерепных гематом частота КО и ВЧГМО составляет около 3,0–18,2% [2]. С появлением компьютерной и магнитно-резонансной томографии появилась возможность определять количественные характеристики гематомы, сроки её образования, локализацию, вид, однако данные методы не позволяют оценивать степень травматического воздействия на другие, визуально неизменные отделы головного мозга и возможности ремоделирования нервной ткани в посттравматическом периоде [3]. В этой связи определение в динамике содержания нейроцитохимических маркеров в сыворотке крови является перспективным методом, позволяющим достоверно оценивать состояние вещества головного мозга при черепно-мозговой травме [4, 5].

**Цель:** выявить особенности ремоделирования нервной ткани у больных с КО и ВЧГМО на основании динамических изменений содержания нейроцитохимических маркеров в сыворотке крови.

**Методы исследования.** Объектом исследования явились 45 пациентов обоего пола в возрасте  $43 \pm 7,5$  лет КО и ВЧГМО, находившихся в клинике нейрохирургии ГУЗ «Саратовская городская клиническая больница № 1 им. Ю.Я. Гордеева» в период с 2011 по 2013 гг и 45 условно здоровых лиц, не имеющих в анамнезе указаний на повреждения и заболевания головного мозга. Критериями включения пациентов в основную группу были максимальный диаметр КО и ВЧГМО менее 4 см; объём оболочечной гематомы менее 30 мл при височной локализации и не более 50 мл при лобной или иной супратенториальной локализации.

Во всех группах обследуемых осуществили взятие образцов периферической крови из кубитальных вен в объеме 5 мл., которые экспонировали при температуре 23 °С и после образования сгустка центрифугировали при 2000 об/мин в течение 10 мин для получения сыворотки.

Характер ответной реакции нервной ткани в посттравматическом периоде изучали на 1-е, 3-и, 7-е, 14-е и 21-е сутки путем определения количественного содержания нейроспецифических белков в сыворотке крови методом иммуноферментного анализа с помощью наборов для определения обще-

го белка S-100 ( $\alpha\beta+\beta\beta$ ) (Fujirebio Diagnostic, AnshLabs, Inc.), нейронспецифической енолазы (NSE) (Fujirebio Diagnostic, AnshLabs, Inc.), глиального кислого фибриллярного белка (GFAP) (BioVendor, Crech Republic), основного белка миелина (MBP) (BCM Diagnostics) в соответствии с инструкциями к их применению.

Статистическую обработку полученных данных осуществляли при помощи пакета программ Statistical Package for the Social Science (IBM SPSS 20 Statistics). Проверяли гипотезы о виде распределений (критерий Шапиро-Уилкса). Большинство полученных данных не соответствовало закону нормального распределения, поэтому для сравнения значений использовали непараметрический U-критерий Манна-Уитни и показатель достоверности ( $p$ ). Результаты считали статистически достоверными при  $p < 0,05$ , что соответствует требованиям, предъявляемым к медико-биологическим исследованиям.

**Результаты:** Уровень общего белка S-100 ( $\alpha\beta+\beta\beta$ ) (нг/мл) на 1-е сутки с момента получения травмы увеличился в 3,2 раза ( $p < 0,001$ ) по сравнению с контролем. На 3-и сутки происходило снижение содержания данного белка в 1,36 раз ( $p < 0,001$ ), на 7-е – в 1,29 и на 14-е сутки – в 1,38 раз ( $p < 0,05$ ). На 21-е сутки статистически значимых изменений исследуемого параметра обнаружено не было ( $p > 0,05$ ). Полученные нами данные о содержании общего белка S-100 ( $\alpha\beta+\beta\beta$ ) соответствуют литературным об увеличении его содержания в первые трое суток с момента получения черепно-мозговой травмы, как реакции астроцитарной глии на повреждение [2].

Содержание MBP (нг/мл) во все сроки наблюдения прогрессивно увеличивалось: на 1-е сутки в 2,77 раза ( $p < 0,001$ ) по сравнению с контрольным значением, на 3-и сутки – в 1,4 раз по сравнению с предыдущими сутками ( $p < 0,001$ ). На 7-е, 14-е и 21-е сутки статистически значимых изменений содержания MBP по сравнению с каждым предыдущими сутками выявлено не было ( $p > 0,05$ ), однако полученные значения были выше контрольного. Наши данные соответствуют литературным сведениям [3] о прогрессирующем увеличе-

нии содержания MBP при деструкции белого вещества головного мозга.

Статистически значимых изменений содержания NSE (мкг/л) в сыворотке крови пациентов во все периоды исследования выявлено не было ( $p > 0,05$ ), что также соответствует данным литературных источников о повышении содержания NSE лишь при массивных повреждениях вещества головного мозга [4].

Уровень GFAP (нг/мл) достигал максимальных значений на 1-е сутки с момента получения травмы – в 9,34 раз по сравнению с контролем ( $p < 0,001$ ), на 3-и сутки статистически значимых изменений содержания исследуемого показателя выявлено не было ( $p > 0,05$ ), однако полученное значение было выше контрольного. На 7-е и 14-е сутки происходило снижение концентрации GFAP – в 3,15 раза ( $p < 0,001$ ) и в 1,32 раз ( $p < 0,05$ ) соответственно. Полученные результаты соответствуют литературным сведениям о двухфазном повышении содержания GFAP в ответ на посттравматическую астроглиальную реакцию головного мозга [3].

**Вывод:** Комплексное исследование уровней содержания нейроспецифических белков в сыворотке крови при КО и ВЧГМО позволяет селективно оценивать на биохимическом уровне отдельные компоненты процесса ремоделирования нервной ткани в посттравматическом периоде, повышая в совокупности чувствительность и специфичность используемых клинко-интраскопических методов диагностики данной патологии.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гайдар Б. В. Практическая нейрохирургия: Руководство для врачей. СПб.: Гиппократ, 2002. 647 с.
2. Бережной Г. А., Лисяный Н. И., Белик Я. В. // Нейрохимия. 1991. № 10 (1–2). С. 76–80.
3. Березин В. А. // Нейрохимия. 1984. Т. 3. № 1. С. 54–70.
4. Лисяный Н. И., Черенько Т. М., Комисаренко С. В. // Невропатология и психиатрия. 1993. Т. 93. № 2. С. 50–53.
5. Конюченко Е. А., Ульянов В. Ю., Гладкова Е. В., Пучиньян Д. М. // Вертебрология в России: итоги и перспективы развития: Сб. тезисов V Съезда хирургов-вертебрологов России. 2014. С. 86–87.



## DYNAMICS OF IMMUNOHISTOCHEMICAL MARKERS OF NEURAL TISSUE REMODELING IN PATIENTS WITH CONTUSION FOCI AND INTRACRANIAL SMALL HEMATOMA

Vygodchikova G. Y.<sup>1</sup>, Ulyanov V. Y.<sup>2</sup>, Chekhonatsky A. A.<sup>1</sup>,  
Kotov S. N.<sup>1</sup>, Chekhonatsky V. A.<sup>1</sup>, Konyuchenko E. A.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>PBE IHE «The Saratov GMU of V. I. Razumovsky» Ministry of Health of Russia;

<sup>2</sup>FBSI Saratov Research Institute of Traumatology and Orthopaedics  
Ministry of Health of Russia, Saratov, Russia

In the serum of 45 patients with contusion foci and intracranial small hematomas the content of neurospecific proteins was studied by enzyme immunoassay. It was found that the remodeling of brain tissue in the posttraumatic period is characterized by dynamic changes of total protein S-100 ( $\alpha\beta + \beta\beta$ ), myelin basic protein, neuron-specific enolase and glial fibrillary acidic protein.

*Key words:* neural tissue, contusion foci, intracranial hematoma, remodeling.

---

---

## КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ОЦЕНКА БИОМАРКЕРОВ АПОПТОЗА И КЛЕТОЧНОЙ РЕГУЛЯЦИИ У ДЕТЕЙ С ПОВЫШЕННЫМ СОДЕРЖАНИЕМ СТРОНЦИЯ В ОРГАНИЗМЕ

Дианова Д. Г.<sup>1</sup>, Вдовина Н. А.<sup>1</sup>, Пирогова Е. А.<sup>1,2</sup>,  
Рочев В. П.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения»; <sup>2</sup>ФГБОУ ВПО «Пермский государственный национальный исследовательский университет», Пермь, Россия

Установлено, что в условиях превышения референсных значений стабильного стронция в крови более чем в 2 раза, статистически значимо ( $p < 0,05$ ) снижается количество CD95<sup>+</sup>-лимфоцитов, активизируется содержание CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>-клеток и экспрессия Ampli-sRANKL ( $p < 0,05$ ), что позволяет предполагать модификацию трансдукции апоптотического сигнала Sr<sup>2+</sup> в диапазоне концентраций 0,0608–0,3710 мг/дм<sup>3</sup>.

*Ключевые слова:* апоптоз, стабильный стронций.

**Актуальность.** Иммунной системе принадлежит ведущая роль в обеспечении и поддержании гомеостаза организма, а также формировании согласованных реакций его отдельных систем в ответ на внешние воздействия, в том числе и на химические техногенные факторы среды [1]. Апоптоз зрелых лимфоцитов является средством регуляции интенсивности и продолжительности иммунного ответа в условиях повышенной антигенной нагрузки [2]. Очевидно, в настоящее время актуальным является раннее выявление нарушений регуляции апоптотической гибели иммунокомпетентной клетки в условиях не-

гативного влияния на организм техногенных химических факторов среды обитания.

**Цель работы** – используя метод проточной цитофлуориметрии и иммуноферментный анализ оценить количественные изменения уровня экспрессии биомаркеров апоптоза у детей при повышенном содержании стабильного стронция (Sr<sup>2+</sup>) в крови.

**Материалы и методы.** Всего, включая группу контроля, обследовано 116 детей младшего дошкольного возраста. Исследование выполнено на примере детского населения, проживающего в различных по содержанию стронция в питьевой воде условиях среды

обитания. Все родители (опекуны) подписали информированное согласие на участие в исследовании и использовании персональных данных. Группу наблюдения составили 63 ребенка, потребляющие воду с содержанием стабильного стронция, превышающим предельно-допустимую концентрацию до 1,2 раза. Группа контроля – 53 ребенка, потребляющие воду с допустимым содержанием стронция. В крови содержание химических элементов (стронций) определяли методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой в соответствии с требованиями СТО М. 12-2013. Определение уровня экспрессии CD3<sup>+</sup>CD95<sup>+</sup> и CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>, а также Вах проводили с использованием меченых моноклональных антител к соответствующему биомаркеру согласно протоколу фирмы производителя (Becton Dickinson, США и Beckman Coulter», США соответственно). Тестирование осуществлялось на проточном цитометре FACSCalibur (Becton Dickinson, США). Уровень экспрессии RANKL (receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand; также обозначается TNFSF11 – tumor necrosis factor ligand superfamily member 11) определяли с помощью иммуноферментного анализа. Статистическую обработку полученных данных осуществляли с помощью программы Statistica 6.0 (StatSoft, США). Для выбора критериев оценки значимости межгрупповых различий средних проверяли соответствие формы выборочных распределений нормальному, используя критерий  $\chi^2$ , а также контролировали равенство генеральных дисперсий с помощью F-критерия Фишера. В случае отклонения от нормального распределения, для сравнения данных использовали непараметрический U-критерий Манна-Уитни. При соответствии данных нормальному распределению использовали t-критерий Стьюдента. Во всех процедурах статистического анализа рассчитывался достигнутый уровень значимости ( $p$ ), при этом критический уровень значимости в данном исследовании принимался равным 0,05.

**Результаты.** Установлено, что у детей группы наблюдения в биологических средах статистически значимо ( $p = 0,001$ ) повышено содержание стронция ( $0,1380 \pm 0,0072$  мг/дм<sup>3</sup>; диапазон концентрации  $0,0608$ – $0,3710$  мг/дм<sup>3</sup>) по сравнению с референсным уровнем ( $0,01$ – $0,077$  мг/дм<sup>3</sup>; P. Heitland, 2006 г.) и статистически значимо ( $p = 0,001$ ) повышено относи-

тельно значений, полученных у детей группы контроля ( $0,0319 \pm 0,0017$  мг/дм<sup>3</sup>; диапазон концентрации  $0,0094$ – $0,0600$  мг/дм<sup>3</sup>). Цитофлуориметрический анализ экспрессии биомаркеров апоптоза показал, что у детей группы наблюдения статистически значимо ( $p = 0,040$ ,  $p = 0,012$  соответственно) снижено процентное содержание CD95<sup>+</sup>-клеток ( $12,27 \pm 2,16\%$ ) и абсолютное число CD95<sup>+</sup>-клеток ( $0,39 \pm 0,06$  10<sup>9</sup>/дм<sup>3</sup>) по сравнению с величинами, идентифицированными у обследуемых контрольной группы ( $16,71 \pm 4,29\%$ ;  $0,39 \pm 0,06$  10<sup>9</sup>/дм<sup>3</sup>). Выявлено, что у детей группы наблюдения абсолютное число CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>-клеток ( $0,05 \pm 0,01$  10<sup>9</sup>/дм<sup>3</sup>) и содержание Ampli-sRANKL ( $34,711 \pm 21,355$  пг/см<sup>3</sup>) статистически значимо ( $p = 0,010$ ;  $p = 0,026$  соответственно) превышает анализируемые показатели, полученные у детей группы контроля (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>:  $0,02 \pm 0,005$  10<sup>9</sup>/дм<sup>3</sup>; Ampli-sRANKL:  $15,535 \pm 4,499$  пг/см<sup>3</sup>). Установлено, что уровень проапоптотического белка Вах ( $8,82 \pm 5,33\%$ ) у детей основной группы регистрируется в диапазоне контрольных величин ( $p > 0,05$ ) ( $9,94 \pm 5,98\%$ ). Использование множественного регрессионного анализа позволило вывести уравнение регрессии, с помощью которого можно определить преобразование вероятности изменения Sr и снижения экспрессии Вах. Вах =  $17,206 - 57,33 \cdot Sr$ ;  $r = -0,506$ ;  $F = 5,346$ ;  $R^2 = 0,256$ ;  $p = 0,036$ .

Решающую роль в регуляции иммунного ответа играет процесс запрограммированной клеточной смерти, запускаемый через так называемые «рецепторы смерти». Значимая роль в регуляции апоптоза отводится такому рецептору как CD95<sup>+</sup> (Fas), величина экспрессии которого отражает готовность лимфоцитов вступить в апоптоз. На наружной мембране митохондрий локализована большая часть белков семейства Bcl-2, в состав которого входят промоторы (Вах, Bid, Bik) и ингибиторы (Bcl-2 и Bcl-XL) апоптоза [3]. От соотношения активности этих белков зависит, состоится апоптоз или нет. RANKL – мембранный белок, продуцируемый клетками остеобластного ряда и активированными Т-лимфоцитами [4]. В зависимости от того, какая клетка является источником RANKL, имеет решающее значение в точке приложения данного цитокина – костная ткань или иммунная система [4]. Очевидно, что у детей с повышенным содержанием стронция в крови происходит изменение трансдукции апоптотического сигнала в иммунокомпетентной клетке.

Таким образом, у детей, в условиях превышения референсных значений  $Sr^{2+}$  в крови более чем в 2 раза, статистически значимо ( $p < 0,05$ ) снижено количество  $CD95^{+}$ -лимфоцитов и статистически значимо ( $p < 0,05$ ) повышены содержание  $CD4^{+}CD25^{+}CD127^{-}$ -клеток и экспрессия Ampli-sRANKL, что позволяет предполагать изменения регуляции Т-лимфоцитарного звена и модификацию трансдукции апоптотического сигнала стронцием в диапазоне концентраций 0,0608–0,3710 мг/дм<sup>3</sup>.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дианова Д. Г., Зайцева Н. В., Долгих О. В. Российский иммунологический журнал, 2012, 2 (1), 45-47.
2. Долгих О. В., Зайцева Н. В., Дианова Д. Г., Вайсман Я. И. Российский иммунологический журнал, 2014, Т 8 (17), 2 (1), 49-51.
3. Tan W., Zhang W., Strasner A., Grivennikov S., Cheng J. Q., Hoffman R. M., Karin M. Nature, 2011, 470, 548-553.
4. Walsh M. C., Choi. Y. Front Immunol. 2014, 5, 511, doi: 10.3389/fimmu. 2014. 00511.

**QUANTITATIVE EVALUATION OF BIOMARKERS  
OF THE APOPTOSIS AND CELL REGULATION IN CHILDREN  
HAVING HIGH CONCENTRATION OF STRONTIUM IN A BODY**

**Dianova D. G.<sup>1</sup>, Vdovina N. A.<sup>1</sup>, Pirogova E. A.<sup>1,2</sup>,  
Rochev V. P.<sup>1,2</sup>**

*Federal Budget Scientific Institution «Federal Scientific Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies», Perm, Russia*

It was found that under the conditions of exceeding the reference value of stable strontium in blood by more than 2 times, the number of  $CD95^{+}$ -lymphocytes is statistically significant ( $p < 0.05$ ) reduced. By this the content of the  $CD4^{+}CD25^{+}CD127^{-}$ -cells and expression of Ampli-sRANKL ( $p < 0.05$ ) is activated that allows to suppose that there is a modification of the transduction of apoptotic signal by  $Sr^{2+}$  in the concentration range of 0.0608–0.3710 mg/dm<sup>3</sup>.

**ОЦЕНКА АКТИВНОСТИ ЭФФЕКТОРОВ ЕСТЕСТВЕННОГО  
(ВРОЖДЕННОГО) ИММУНИТЕТА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ  
БАКТЕРИАЛЬНЫХ ЛЮМИНЕСЦИРУЮЩИХ ТЕСТ-СИСТЕМ**

**Каримов И. Ф., Каримова Д. Н.**

*ФГБОУ ВПО «Оренбургский государственный университет», Оренбург, Россия*

Предложена группа методов оценки активности молекулярных и клеточных эффекторов естественного (врожденного) иммунитета, основанных на учете люминесцентного отклика взаимодействующих с ними бактериальных клеток. Использование штаммов с различным типом строения клеточной стенки позволяет дифференцированно оценивать молекулярные бактерицидные системы сыворотки крови. Применение микроорганизмов с конститутивным или индуцибельным типами свечения предназначено для оценки завершенности фагоцитоза, а также особенностей окислительного метаболизма фагоцитирующих клеток.

*Ключевые слова:* эффекторы иммунитета, комплемент, фагоцитоз, бактериальные биотесты, lux-гены.

Факторы естественного (врожденного) иммунитета являются важными эффекторами иммунной системы, как обеспечивающими

неспецифическую защиту организма от патогенов, так и дополняющими действие механизмов адаптивной защиты. Современная оценка

данного звена иммунной системы осуществляется либо с помощью иммуноферментного анализа, позволяющего выявить содержание отдельных молекулярных факторов в изучаемом образце, либо с использованием проточной цитометрии, способной оценить число различных клеток и уровень экспрессии в них определенных кластеров дифференциации. Однако такой подход далеко не всегда отражает функциональное состояние факторов естественного иммунитета, так как демонстрирует только их количественное присутствие, но не функциональную активность в отношении бактериальных патогенов. В свою очередь решающие эту задачу микробиологические биотесты, направленные на оценку комплемент-зависимой и бета-литической активности сыворотки крови, а также завершенность фагоцитоза, преимущественно разработаны в середине XX века и по своей технологичности, трудоемкости и экспрессности не соответствуют требованиям, предъявляемым к современным лабораторным диагностическим технологиям.

Целью настоящей работы стало обоснование нового подхода к оценке активности молекулярных и клеточных эффекторов естественного (врожденного) иммунитета, основанного на учете реакции взаимодействующих с ними рекомбинантных люминесцирующих бактерий. При этом клонирование *lux*-генов под контролем конститутивных промоторов позволяет достичь у подобных микроорганизмов исходно высокой интенсивности свечения, тушение которой является индикатором развития бактерицидного эффекта. С другой стороны, клонирование тех же генов под контролем индуцируемых промоторов, транскрибируемых при развитии определенного вида стресса, позволяет по интенсивности развивающегося свечения судить о выраженности соответствующего специфического воздействия [1].

При проведении исследований использованы микроорганизмы с конститутивным типом свечения, представленные *E. coli* K12 TG1 с *luxCDABE*-генами *P. leiognathi*, *S. typhimurium* LT2 и *E. coli* MG1655 с *luxCDABE*-генами *P. luminescens*, а также *B. subtilis* ВКПМ В-10548 с *luxAB*-генами *P. leiognathi*. Группа люминесцирующих микроорганизмов с индуцибельным типом свечения включала штаммы *E. coli* MG1655 и *S. typhimurium* LT2, несущие плазмиды с генными слияниями *soxS:: luxCDABE*, *katG:: luxCDABE* и *recA:: luxCDABE*, активи-

руемыми при возникновении окислительного стресса или повреждении ДНК бактериальных клеток-мишеней. Аттестованные с их использованием объекты включали серию индивидуальных сывороток крови человека, предварительно исследованных на содержание фактора Н и С3, С4, С5 компонентов комплемента методом твердофазного ИФА, а также лизоцимной и бета-литической активностей с использованием фотонепелометрических методов. Моноциты и гранулоциты получали из периферической крови человека на двойном градиенте фиколл-верографин с последующей отмывкой физиологическим раствором и ресуспендированием в среде 199.

Использование люминесцирующих микроорганизмов с конститутивным типом свечения позволило с высокой чувствительностью и экспрессностью провести оценку бактерицидной активности сыворотки крови, основанную на соответствии уровня остаточной биолюминесценции и выраженности развивающейся в подобных условиях гибели бактериальных клеток-мишеней [2]. При этом взаимодополняющее использование рекомбинантных грамотрицательного (*E. coli* K12 TG1) и грамположительного (*B. subtilis* ВКПМ В-10548) микроорганизмов позволило эффективно дифференцировать комплемент-зависимую и бета-лизин-зависимую бактерицидность как следствие избирательной чувствительности данных штаммов к соответствующим молекулярным эффекторам естественного иммунитета [3].

Другим направлением использования люминесцирующих микроорганизмов с конститутивным типом свечения стала оценка завершенности фагоцитоза. При этом особенности строения клеточной стенки тест-штаммов на основе *E. coli* MG1655 и *S. typhimurium* LT2 потребовали разработки особой процедуры их опсонизации, исключавшей не связанный с фагоцитозом бактерицидный эффект и реализованной с использованием нормального иммуноглобулина человека. Решение ряда других методических вопросов, определяемых обоснованием оптимального соотношения «бактерии: фагоциты», а также доказательством четкой зависимости тушения биолюминесценции от интенсивности гибели бактериальных клеток-мишеней, явилось обоснованием чувствительного и экспрессного биолюминесцентного метода оценки фагоцитоза [4]. Кроме

того, различия в спектрах люминолзависимой хемилюминесценции люминола, используемого для оценки респираторного метаболизма фагоцитов, и биолюминесценции фагоцитируемых бактериальных клеток, позволили одновременно оценивать оба типа свечения в двух спектральных диапазонах [5].

Новая возможность оценки окислительного метаболизма фагоцитов возникла после разработки рекомбинантных люминесцирующих микроорганизмов с индуцибельным типом свечения, несущих кассеты *lux*-генов под контролем промоторов *soxS* и *katG*, вовлеченных в защиту бактериальных клеток при окислительном стрессе, вызванном воздействием супероксид-аниона и перекиси водорода. При этом зарегистрирована преимущественная индукция свечения штаммов с генным слиянием *soxS::luxCDABE* при контакте с моноцитами, тогда как штаммы, несущие конструкцию *katG::luxCDABE* наиболее выражено индуцировались при контакте с гранулоцитами, что может определяться различиями в генерируемых ими спектрах активных метаболитов кислорода. Кроме того, штамм *E. coli* MG1655 *recA::luxCDABE* при контакте с гранулоцитами также демонстрировал развитие свечения, что свидетельствует об активации его SOS-ответа как следствия повреждения ДНК генерируемыми при фагоцитозе активными формами кислорода.

Таким образом, полученные результаты являются экспериментальным обоснованием новой группы лабораторных методов, реализуемой на единой технологической платформе с использованием оригинальной панели бактериальных люминесцирующих биотестов, соответствующего инструментального и программного обеспечения. При этом высокая чувствительность, специфичность и экспрессность подобного подхода позволяет предполагать его востребованность при проведении диагностических исследований, ориентированных на выявление врожденных и приобретенных нарушений молекулярных и клеточных эффекторов естественного (врожденного) иммунитета.

Исследования выполнены при финансовой поддержке РФФИ (проект № 15-44-02280 р\_поволжье\_а).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дерябин Д. Г. Москва. 2009. 246 с.
2. Каримов И. Ф., Манухов И. В., Котова В. Ю. и др. Биотехнология. 2010. 2. С. 25-30.
3. Дерябин Д. Г., Каримов И. Ф., Манухов И. В. и др. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2012. 7. С. 68-73.
4. Дерябин Д. Г., Каримов И. Ф. Клиническая лабораторная диагностика. 2010. 2. С. 23-29.
5. Дерябин Д. Г., Каримов И. Ф. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2009. 3. С. 322-326.

#### DIAGNOSTICS OF INNATE IMMUNITY FACTORS' ACTIVITY BY BACTERIAL LUMINESCENT TEST-SYSTEMS

Karimov I. F., Karimova D. N.

Orenburg State University, Orenburg, Russia

Group of methods for assessing the activity of molecular and cellular effectors of innate immunity based on luminescent response of interacting with them bacteria was offered. Differential diagnostics of molecular systems using the strains with different types of cell wall reveals an alternative bactericidal system. The application of microorganisms with constitutive or induced luminescence is possible to evaluate the completeness of phagocytosis, and the specific features of the phagocyte oxidative metabolism.

*Keywords:* immunity effectors, complement, phagocytosis, bacterial biotests, *lux*-genes.

## ПРОТОЧНАЯ ЦИТОМЕТРИЯ В ОПРЕДЕЛЕНИИ СПЕКТРА ЛИМФОЦИТОВ ПРИ РАЗНЫХ ФОРМАХ СЕБОРЕЙНОГО КЕРАТОЗА

Костенко Е. И.

ГБОУ ВПО Южно-Уральский государственный медицинский университет,  
Челябинск, Россия

Изучены показатели спектра лимфоцитов при разных формах себорейного кератоза. Установлено усиление интенсивности моноцитопоза, перераспределительные тенденции в изменении численности Т-популяции, признаки ранней позитивной активации иммуноцитов и антителообразования на фоне сохранности врожденных механизмов иммунитета, наиболее выраженные при папулезно-пятнистой форме себорейного кератоза.

*Ключевые слова:* себорейный кератоз, субпопуляции лимфоцитов, маркеры активации.

Актуальность проблемы эпителиальных новообразований кожи связана с широким распространением данной патологии среди населения, риском онкологической трансформации, ранней манифестацией [1, 2]. Эпителиальные опухоли кожи составляют более 60% случаев среди общей обращаемости по поводу кожных новообразований. Себорейный кератоз (СК) относится к доброкачественным эпителиальным опухолям кожи, имеющим характерные разрастания акантотических тяжей эпидермиса с роговыми кистами. Согласно гистологическим особенностям выделяют кератотический, акантотический, аденоидный и смешанный тип СК. Чаще себорейный кератоз поражает лиц пожилого и старческого возраста, гендерных различий не наблюдается. Малоизученными остаются вопросы иммунного реагирования на формирование различных форм себорейного кератоза [3].

**Целью исследования** явилось изучение популяционного и субпопуляционного спектра лимфоцитов, маркеров активации иммунных клеток у пациентов с различными формами себорейного кератоза.

**Материалы и методы:** Основную группу исследования составил 91 пациент с себорейным кератозом. Из них 62 женщины (68,1%), мужчин – 29 (31,8%) человек. Возраст больных с СК на момент проведения исследования составил от 40 лет до 75 лет (средний  $59,2 \pm 6,4$ ). Согласно клиническим критериям пациенты с СК были разделены на 3 группы: 1 группа –

18 пациентов с пятнистой формой СК; 2 группа – 12 пациентов с СК с папулезной формой СК; 3 группу составил 61 пациент с пятнисто-папулезной формой СК. Контрольную группу (4) составили 30 условно здоровых лиц (средний возраст  $63,8 \pm 5,4$  года). Верификацию СК проводили с использованием дерматоскопа HEINE 20 (Германия). Материалом для исследования являлась венозная кровь, которую забирали утром, натощак. Определение популяционного и субпопуляционного спектра лимфоцитов периферической крови проводили методом проточной цитометрии, на лазерном проточном цитометре Epics™XL™ Beckman Coulter, США с использованием гомогенного гейтирования по показателям светорассеивания. Для окрашивания были использованы двухпараметрические реагенты линии IQTest: CD3-FITC/CD19-PE, CD3-FITC/CD4-PE, CD3-FITC/CD8-PE, CD3-FITC/CD(16+56)-PE, CD3-FITC/CD25-PE, CD3-FITC/HLA-DR-PE фирмы Beckman Coulter, США. Достоверность различий оценивали в рамках программы Statistica StatSoft 6.0, согласно критериям непараметрической статистики (U-test Mann-Whitney).

**Результаты и обсуждение:** Согласно исследованиям популяционного и субпопуляционного спектра лимфоцитов у пациентов с разными формами себорейного кератоза, установлены следующие особенности: во всех группах пациентов с СК отмечено значимое повышение в циркуляции абсолютного и от-

носительного уровня моноцитов, что отражает интенсивность моноцитопоэза на уровне центральных органов гемопоэза; снижение относительного числа популяции Т-лимфоцитов у пациентов с папулезной ( $71,9 \pm 1,0\%$ ) и папулезно-пятнистой ( $72,9 \pm 1,04\%$ ) формами СК в сравнении с контрольной группой ( $77,3 \pm 1,86\%$ ); абсолютного ( $515,7 \pm 29,3 \times 10^9/\text{л}$ ) и процентного ( $24,2 \pm 1,19\%$ ) содержания Т-цитотоксических лимфоцитов при пятнисто-папулезной форме в сравнении с контрольной ( $29,4 \pm 1,2\%$ ;  $684,5 \pm 82,3 \times 10^9/\text{л}$ ), свидетельствующее, как о перераспределении клеток, связанное с миграцией последних в ткани, так и о снижении их продукции в костном мозге. Со стороны Т-НК лимфоцитов, принадлежность которых к НК фенотипу определяется наличием изоформы N-CAM антигена CD56, отмечена тенденция роста, как процентного, так и абсолютного у пациентов со всеми формами СК. Напротив, при изучении численности в системной циркуляции клеток врожденного иммунитета (НК) отмечено повышение их процентного содержания в кровотоке у пациентов с пятнистой формой СК ( $12,6 \pm 1,02\%$ ) в сравнении с контрольной группой ( $9,4 \pm 1,3\%$ ), что может свидетельствовать об активации неспецифических факторов защиты, одной из главных функций которых является защита организма от видоизмененного «своего». При этом, поверхностные маркеры, экспрессируемые активированными НК-клетками включают ряд и активационных маркеров (CD25, HLA-DR, CD71, CD69, Fc-рецепторы (CD29) и интегринов (CD18). Известно, что количественные и качественные дефекты НК-клеток приводят к задержке своевременной элиминации опухолевых клеток и нарушению продукции хемокинов (CCL3,

CCL4, CCL5 и XCL1) и цитокинов (GM-CSF, TGF- $\beta$ , IFN- $\gamma$ ). Отмечена отчетливая тенденция к росту в циркуляции популяции лимфоцитов, экспрессирующих маркеры ранней позитивной активации CD25, во всех группах, однако, за счет большого разброса показателей, не достигающая степени статистической достоверности. При изучении количества В-лимфоцитов, установлено повышение процентного содержания В-лимфоцитов в группе с папулезно-пятнистой формой СК ( $10,4 \pm 0,62\%$ ), в отличие от контрольной группы ( $7,9 \pm 0,7\%$ ), что может отражать как усиление процессов антителообразования, так и антигенной презентации, поскольку В-лимфоциты экспрессируют молекулы главного комплекса гистосовместимости (HLA II класса), что определяет принадлежность данных клеток к профессиональным АПК.

Таким образом, при всех изучаемых формах СК отмечено усиление интенсивности моноцитопоэза, перераспределительные тенденции в изменении численности Т-популяции, признаки ранней позитивной активации иммуноцитов на фоне сохранности врожденных механизмов иммунитета и антителообразования наиболее выраженных при папулезно-пятнистой форме себорейного кератоза.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ламоткин И. А. Клиническая дерматология: атлас / И. А. Ламоткин. – М.: БИНОМ: Лаборатория знаний. – 2011. – 499 с.: ил.
2. Ламоткин И. А. Опухоли и опухолеподобные поражения кожи: атлас / И. А. Ламоткин. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний. – 2006. – 166 с.
3. Кладова А. Ю., Кувейда Д. А., Молочков В. А. и др. // Альманах клинич. медицины. – 2006. – № 9. – С. 44-50.

### FLOW CYTOMETRY TO DETERMINE THE SPECTRUM OF LYMPHOCYTES WITH DIFFERENT FORMS OF SEBORRHEIC KERATOSIS

Kostenko E. I.

*Medical University of South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russia*

The parameters of the spectrum of lymphocytes in various forms of seborrheic keratosis. Established intensification monocytopoiesis, redistributive trends in the number of T-populations, early signs of positive activation of immune cells and antibody production against the background of safety mechanisms of innate immunity, most pronounced in the papular-spotted form of seborrheic keratosis.

*Keywords:* seborrheic keratosis, lymphocyte subsets, activation markers.

## ОСОБЕННОСТИ ИММУННОГО СТАТУСА ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У БОЛЬНЫХ ФЕНИЛКЕТОНУРИЕЙ

Курбатова О. В.<sup>1</sup>, Бушуева Т. В.<sup>2</sup>, Самохина И. В.<sup>2</sup>,  
Мирошкина Л. В.<sup>2</sup>, Фрейдлин Е. В.<sup>2</sup>, Кузенкова Л. М.<sup>2</sup>,  
Боровик Т. Э.<sup>2</sup>, Петричук С. В.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ФГБНУ НЦАГиП имени ак. В. И. Кулакова МЗ РФ; <sup>2</sup>ФГБНУ «Научный центр  
здоровья детей», Москва, Россия

В данной работе представлены результаты исследования иммунного статуса лимфоцитов периферической крови у пациентов с фенилкетонурией в зависимости от уровня фенилаланина в сыворотке крови и возраста. Под наблюдение находилось 45 больных с классической ФКУ в возрасте от 6 месяцев до 36 лет. Иммунофенотипирование лимфоцитов периферической крови осуществлялось методом проточной цитофлуориметрии (FC 500, VC) согласно стандартным протоколам. При повышенном уровне фенилаланина в сыворотке крови отмечалось снижение абсолютного числа Т-лимфоцитов преимущественно за счет цитотоксических Т-лимфоцитов, выявлено увеличение количества активированных Т-хелперов. Указанные изменения более выражены у пациентов старше 12 лет. Большинство пациентов с ФКУ имели сниженное количество В-лимфоцитов. Количество НК-клеток у пациентов с ФКУ соответствовало возрастной норме. Таким образом, полученные данные указывают на разную степень чувствительности клеток иммунной системы к действию повышенного уровня ФА в крови больных ФКУ. Возрастная динамика абсолютного числа основных популяций лимфоцитов и относительного количества малых популяций лимфоцитов периферической крови у пациентов с ФКУ соответствовала таковой у условно здоровых лиц.

*Ключевые слова:* фенилкетонурия, фенилаланин, иммунофенотип лимфоцитов.

**Актуальность и цель работы.** Фенилкетонурия (ФКУ) – наследственное нарушение преобразования фенилаланина (ФА) в тирозин. Основным методом лечения ФКУ является длительная элементная диета со строгими ограничениями натурального белка в детском возрасте и последующим расширением рациона у подростков старше 12 лет и взрослых пациентов. Во всех случаях дефицит белка компенсируется за счет специальных смесей на основе аминокислот без фенилаланина. Уровень ФА в сыворотке крови, допустимый для детей с рождения до 12 лет, не должен превышать 360 мкмоль/л (6 мг%) и длительно держаться ниже 120 мкмоль/л, у пациентов старше 12 лет терапевтический диапазон содержания ФА в крови составляет 120-600 мкмоль/л. Расширение диеты часто сопровождается снижением квоты общего белка за счет уменьшения потребеления больными специальных аминокислотных смесей без ФА и увеличением

квоты натурального белка, что усиливает дисбаланс аминокислот [1]. Известно, нарушения метаболизма белка, являющиеся следствием острого психологического или физического стресса (например у спортсменов) приводят к изменениям иммунного статуса и, в частности, клеточного иммунитета [2]. Ранее нами были описаны изменения клеточного иммунитета у пациентов с ФКУ старше 12 лет, выражающиеся в активации Th17-лимфоцитов [3], что согласуется с данными Roato et. al., который обнаружил активацию Т-клеток у больных ФКУ старшего возраста с явлениями остеопороза на фоне несоблюдения диеты и повышенного ФА в крови [4]. Однако, прямые данные о влиянии повышенного уровня ФА на состояние клеточного иммунитета у больных ФКУ отсутствуют, поэтому исследование иммунофенотипа лимфоцитов периферической крови у этих пациентов представляет большой интерес.



**Цель исследования** – определить возрастные особенности иммунного статуса лимфоцитов периферической крови у пациентов с ФКУ в зависимости от уровня ФА в сыворотке крови.

**Материалы и методы.** В исследовании и приняло участие 45 пациентов с классической ФКУ в возрасте от 6 месяцев до 36 лет, из которых 16 детей были младше 12 лет, 29 – старше 12 лет. У 32 пациентов заболевание было диагностировано в результате неонатального скрининга, у 13 больных метаболические нарушения были выявлены позже на фоне развившихся симптомов. На момент обследования все больные находились на гипопенилаланиновой или расширенной диете, диапазон колебаний ФА в сыворотке крови составлял от 24,2 мкмоль/л до 1511 мкмоль/л, среднее содержание ФА у обследованных пациентов было  $586 \pm 382$  мкмоль/л.

Пациенты были распределены на группы в зависимости от соответствия уровня ФА допустимым возрастным значениям: I группа (n=23) – пациенты с допустимым уровнем ФА в крови, II группа – пациенты с уровнем ФА выше допустимого. Содержание ФА в крови выше 360 мкмоль/л отмечалось у 6 детей младше 12 лет, выше 600 мкмоль/л – у 16 больных старше 12 лет. Иммунофенотипирование лимфоцитов (лф) периферической крови осуществлялось методом проточной цитофлуориметрии (FC 500, BC) согласно стандартным протоколам [5]. Определяли абсолютное и относительное количество Т-лф, В-лф, НК-клеток, Т-хелперов, цитотоксических Т-лф, а также популяций В1-лф, В2-лф, регуляторных Т-лф, активированных Т-хелперов. Для сравнения иммунологических показателей у пациентов разных возрастов данные были пересчитаны в процентах отклонения от соответствующего возрастного референсного интервала, нижняя граница соответствовала 0%, верхняя граница 100%. Статистическую обработку проводили с помощью программы Statistica 6.0, данные представлены в виде медианы (Me) процента отклонений от референсного интервала (Me; нижняя-верхняя квартиль), для сравнения использовали непараметрический критерий Манна-Уитни, значимыми считались различия при  $p < 0,05$ . Для анализа возрастной динамики пациенты были распределены на 4 возрастных диапазона: от 0 до 2-х лет (число наблюдений 13), от 2-х до 6 лет (12), от 12 до 18 лет (13) и старше 18 лет (17 наблюдений).

**Результаты.** У всех пациентов с ФКУ абсолютное число Т-лф было в пределах возрастных референсных значений. Однако, в группе больных с повышенным уровнем ФА (II гр.) выявлено значимое снижение Т-лф по сравнению с больными с допустимым уровнем ФА (I гр.): Me I гр = 49,0% (14,6–73,2), Me II гр = 0,4% (–35,2–37,8),  $p = 0,023$ . При этом степень снижения Т-лф отличалась у пациентов разного возраста: у детей младше 12 лет абсолютное значение Т-лф соответствовало норме Me = 48,8% (31,2–63,3), а у пациентов старше 12 лет было ниже нормы Me = –20,3% (–50,0–18,7),  $p = 0,048$ . Количество Т-хелперов у пациентов I группы и группы II достоверно не отличалось между собой и соответствовало возрастному референсному интервалу: Me I гр = 44,9% (12,4–69,4), Me II гр = 30,3% (–16,1–57,8),  $p = 0,433$ . У пациентов I группы с допустимым уровнем ФА количество цитотоксических Т-лф соответствовало норме (Me = 19,6% (10,9–52,3)), а у больных II группы было снижено (Me = –35,4% (–57,2–8,2)),  $p = 0,0003$ . Снижение числа Т-лимфоцитов у пациентов II группы старше 12 лет обусловлено снижением только цитотоксических Т-лф (Me = –43,9% (–6,8–27,6)), количество которых было значимо ниже по сравнению с пациентами младше 12 лет (Me = 20,2% (14,6–28,2)),  $p = 0,019$ . Следствием выявленных нарушений явилось увеличение иммунорегуляторного индекса у пациентов II группы старше 12 лет.

Значимых различий абсолютного числа НК-клеток у пациентов I и II групп выявлено не было: Me I гр = 14,5% (1,3–77,1), Me II гр = 13,8% (4,4–34,6),  $p = 0,510$ . Отмечено снижение количества НК-клеток с возрастом, что соответствует нормальной возрастной динамике.

Значимых различий по количеству В-лф у пациентов I и II групп также не отмечалось: Me I гр = –2,7% (–43,7–42,5), Me II гр = –29,5% (–37,8–21,8),  $p = 0,707$ . Однако у 52,6% детей I группы и у 73% пациентов II-й группы число В-лф было ниже нижней границы нормы. Выявленное снижение общего количества В-лф у детей с ФКУ происходило за счет снижения числа клеток в популяциях В1-лф и В2-лф. Возрастная динамика количества В1-лф и В2-лф у больных I и II групп соответствует таковой у условно здоровых лиц.

Анализ малых популяций лимфоцитов у всех пациентов с ФКУ выявил снижение абсолютного количества регуляторных Т-лф и увеличение числа активированных Т-хел-

перев с возрастом, что соответствует динамике этих показателей у здоровых лиц. У пациентов с повышенным содержанием ФА в крови (группа II) отмечено более выраженное увеличение количества активированных Т-хелперов (% от CD4) по сравнению с пациентами, у которых уровень ФА был в пределах допустимых значений: Ме I гр =6,4% (3,8–10,6), Ме II гр=11,1% (9,3–13,4),  $p=0,033$ . Достоверных отличий в уровне регуляторных Т-лф (% от CD4) между I и II группами выявлено не было: Ме I гр =8,3% (7,4–9,2), Ме II гр=8,8% (7,0–9,5),  $p=0,99$ .

**Заключение.** У больных ФКУ с различным уровнем фенилаланина выявлены изменения иммунофенотипа лимфоцитов периферической крови. При повышенном уровне фенилаланина в сыворотке крови отмечалось снижение абсолютного числа Т-лимфоцитов преимущественно за счет цитотоксических Т-лимфоцитов, при этом выявлено увеличение количества активированных Т-хелперов. Указанные изменения более выражены у пациентов старше 12 лет. Большинство пациентов с ФКУ имели сниженное количество В-лимфоцитов, причем в группе с повышен-

ным содержанием фенилаланина в крови таких больных было больше. Количество НК-клеток у пациентов с ФКУ соответствовало возрастной норме. Таким образом, полученные данные указывают на разную степень чувствительности клеток иммунной системы к действию повышенного уровня ФА в крови больных ФКУ. Возрастная динамика абсолютного числа основных популяций лимфоцитов и относительного количества малых популяций лимфоцитов периферической крови у пациентов с ФКУ соответствовала таковой у условно здоровых лиц.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бушуева Т. В., Боровик Т. Э. Вопросы современной педиатрии 2010, 9 (2), 124-129.
2. Трушина Э. Н. и др. Вопросы питания 2012, 81 (3), 92-98.
3. Bushueva T. V. et al. J Inherited Metabolic Disease 2013, 36 (2), 122.
4. Roato I., Porta F., Mussa A. et al. PLoS One 2010, 5 (11), e14167.
5. Хайдуков С. В., Байдун Л. В., Зурочка А. В., Тоталян А. А. Российский иммунологический журнал 2014, 8 (4), 974-992.

#### FEATURES OF THE IMMUNE STATUS OF PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES IN PATIENTS WITH PHENYLKETONURIA

Kurbatova O. V.<sup>1</sup>, Bushueva T. V.<sup>2</sup>, Samohina I. V.<sup>2</sup>, Miroshkina L. V.<sup>2</sup>,  
Freidlin E. F.<sup>2</sup>, Kuzenkova L. M.<sup>2</sup>, Borovik T. E.<sup>2</sup>, Petrichuk S. V.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>FSBI "Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology" Ministry of Healthcare of the Russian Federation; <sup>2</sup>FSBI "Scientific Centre of Children Health" under the Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, Russia

This paper presents the results of a study of the immune status of peripheral blood lymphocytes in patients with phenylketonuria (PKU) depending on the level of phenylalanine (Phe) in the blood serum and age. The study involved 45 patients with classical PKU in age from 6 months to 36 years. The lymphocytes subsets of peripheral blood were evaluated by flow cytometry (FC 500, BC) according to standard protocols. The absolute number of T lymphocytes in PKU patients with elevated Phe blood level was decreased on account of cytotoxic T lymphocytes. There was increased number of activated T-helper cells in these patients. These changes were more pronounced in patients older than 12 years. Most patients with PKU showed a decrease in the number of B-lymphocytes. Number NK-cells in patients with PKU corresponded age norm. Thus, these data indicate varying degrees of sensitivity of immune system cells to the action of elevated levels of Phe in the blood of PKU patients. Age dynamics of the absolute number of main lymphocyte populations and the relative number of minor populations of peripheral blood lymphocytes in patients with PKU reflect the same age dynamics of healthy individuals.

## НЕОПТЕРИН КАК ЛАБОРАТОРНЫЙ МАРКЕР АКТИВНОСТИ САРКОИДОЗА ЛЕГКИХ

Москалец О. В., Яздовский В. В.

МОНИКИ им. М. Ф. Владимирского, Москва, Россия

У 111 больных саркоидозом легких с разными рентгенологическими стадиями заболевания определяли количество лимфоцитов в БАЛЖ и содержание неоптерина в сыворотке периферической крови. Отмечалась положительная корреляционная связь между уровнем сывороточного неоптерина и количеством лимфоцитов БАЛЖ, а также уровнем неоптерина и рентгенологической стадией заболевания. В то же время, у 40% больных с прогрессированием заболевания уровень сывороточного неоптерина был в пределах нормальных значений. Таким образом, мониторинг уровня неоптерина в сыворотке периферической крови не является надежным инструментом для оценки активности воспаления при саркоидозе органов дыхания.

*Ключевые слова:* саркоидоз, неоптерин, иммунитет.

Саркоидоз относится к иммунокомплексным заболеваниям, морфологическим субстратом которого является макрофагально-лимфоцитарная гранулёма. В 80–90% случаев поражаются лёгкие и внутригрудные лимфатические узлы, нередко встречается и генерализация процесса. Данные литературы, касающиеся иммунологических механизмов саркоидоза, достаточно противоречивы, основное внимание уделяется Т-клеточному звену [1, 2]. Несмотря на развитие лучевых методов диагностики, поиск надежных лабораторных критериев, позволяющих оценить активность заболевания и прогнозировать его течение, по-прежнему актуален. Наиболее информативно исследование бронхо-альвеолярной лаважной жидкости, однако технически это не всегда выполнимо. Достаточно много работ посвящено гамма-интерферону, растворимому рецептору интерлейкина-2, неоптерину, а также различным субпопуляциям лимфоцитов [2, 3].

**Цель исследования:** оценить надежность определения сывороточного неоптерина в качестве лабораторного маркера активности воспалительного процесса при легочном саркоидозе

**Материалы и методы.** В исследование было включено 111 некурящих больных саркоидозом легких (98 женщин и 13 мужчин в возрасте от 30 до 68 лет, средний возраст 47,6 лет). Всем больным проводилась компьютерная томография легких и органов средостения, а также цитологическое исследование бронхоальвеолярного лаважа (БАЛЖ) с подсчетом лимфоцитов.

Определение уровня неоптерина в сыворотке периферической крови выполнялось методом твердофазного иммуноферментного анализа на тест-системе фирмы IBL (Австрия).

**Результаты.** Анализ полученных результатов выявил наличие прямой корреляционной связи между количеством лимфоцитов в БАЛЖ и уровнем сывороточного неоптерина ( $r=0,26$ ,  $p=0,027$ ). В то же время, значимого изменения количества лимфоцитов в БАЛЖ при нарастании рентгенологических изменений не отмечено.

При сопоставлении уровня сывороточного неоптерина с рентгенологической картиной получены следующие данные. Первая рентгенологическая стадия заболевания была у 39 пациентов, содержание неоптерина в этой группе – 9,0 нмоль/л [7,0–4,4]. Вторая стадия – у 57 больных, третья – у 15 больных. Содержание неоптерина в этих группах, соответственно, было 16,0 [11,5–22,3] и 10,2 [4,7–21,0] ( $p=0,01$  в сравнении с первой стадией).

**Обсуждение.** Неоптерин [2-амино-4-гидрокси-6-(D-эритро-1',2',3'-тригидроксипропил)] относится к соединениям класса птеридинов. Несмотря на многочисленные исследования, его биологическая роль до сих пор окончательно не выяснена. Физиологические концентрации неоптерина и его производных невысоки, в сыворотке крови они не превышают 10 нМ/л. Могут встречаться небольшие колебания в зависимости от возраста, расы, курения, физиологического состояния.

Основной интерес к неоптерину связан с тем, что он является маркером активации клеточного иммунитета. При патологических состояниях, связанных с активацией иммунной системы, концентрация сывороточного неоптерина может достигать 100-250 нМ/л.

В настоящее время установлено, что основным источником неоптерина в организме человека являются моноциты/макрофаги. Они начинают активно продуцировать неоптерин под влиянием  $\gamma$ -интерферона ( $\gamma$ -ИФН), который вырабатывают активированные Т-лимфоциты (в основном, это субпопуляция Т-хелперов I типа). Другие клетки иммунной системы (NK-клетки, дендритные клетки) также способны вырабатывать  $\gamma$ -ИФН, но их роль в индукции синтеза неоптерина пока не выяснена. Под влиянием  $\gamma$ -ИФН происходит активация фермента ГТР СН-I в макрофагах и лимфоцитах. Есть данные, что и дендритные клетки под влиянием  $\gamma$ -ИФН способны продуцировать неоптерин, но, в отличие от макрофагов, они более чувствительны к действию других типов интерферонов ( $\alpha$ -ИФН и  $\beta$ -ИФН). Под влиянием  $\gamma$ -ИФН неоптерин могут вырабатывать и другие клетки: эндотелиальные, почечный эпителий, фибробласты. Но уровень продукции значительно ниже, чем в макрофагах.

Вырабатываемый альвеолярными макрофагами неоптерин участвует в патогенезе саркоидоза и других интерстициальных заболеваний легких. Он усиливает процессы транскрипции различных провоспалительных цитокинов в клетках-участницах воспалительного процесса. Повышение уровня неоптерина обнаружено не только в сыворотке периферической крови, но и в БАЛЖ. Количество синтезируемого неоптерина коррелирует и с другими показателями активности воспалительного процесса: активными формами кислорода, продуцируе-

мыми альвеолярными макрофагами, провоспалительными цитокинами и др.

В данном исследовании удалось подтвердить взаимосвязь между уровнем сывороточного неоптерина и рентгенологической стадией саркоидоза. При 1-й стадии, когда поражение легочной паренхимы минимально, данный показатель остается в пределах нормы. Нарастание концентрации неоптерина при 2-й стадии можно объяснить увеличением количества эпителиоидно-клеточных гранулем в легочной ткани. Исчезновение внутригрудной лимфаденопатии при сохраняющихся изменениях легочного рисунка, что характерно для 3-й стадии, сопровождалось тенденцией к снижению уровня неоптерина. Вместе с тем, у 6 из 15 (40%) пациентов с неспецифическими симптомами воспаления (субфебрильная лихорадка, артралгии, уменьшение массы тела), повышением белков острой фазы (СРБ, фибриноген), рентгенологическими признаками прогрессирования заболевания содержание неоптерина не превышало нормальных значений.

**Выводы:** Содержание неоптерина в сыворотке периферической крови, в основном, совпадает с рентгенологической стадией саркоидоза органов дыхания, но не всегда совпадает со степенью воспалительной активности. Поэтому лабораторный мониторинг данного маркера не может быть надежным критерием оценки динамики воспалительного процесса при саркоидозе.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Чучалин А.Г, ред. Саркоидоз. //Казань: КГМУ.– 2010.– 58 с.
2. Bargagli E., Mazzi A., Rottoli P. // Clin.Chest Med.– 2008.– 29 (3).– P. 445-458.
3. Wachter H., Fuchs D., Hausen A., et al. //Adv. Clin. Chem.– 1998.– v.27.– P. 81-141.

### NEOPTERIN AS A PULMONARY SARCOIDOSIS ACTIVITY MARKER

Moskalets O. V., Yazdovskii V. V.

*The State Budgetary Healthcare Institution of Moscow Region  
"M.F. Vladimirsky Moscow Regional Research Clinical Institute", Moscow, Russia*

BAL fluid lymphocyte counts and serum neopterin levels were measured in 111 patients with pulmonary sarcoidosis with different radiographic stages. Serum neopterin levels correlated with BAL fluid lymphocyte counts as well as with radiographic stage. Nevertheless, 40% patients with disease progression showed normal neopterin levels. Conclusion: serum neopterin levels should not be used for reliable monitoring of inflammation in pulmonary sarcoidosis.

## ИЗУЧЕНИЕ МЕТОДОВ ДИАГНОСТИКИ ХЛАМИДИЙНЫХ УРЕТРИТОВ СМЕШАННОЙ ЭТИОЛОГИИ

Муслимов М. О., Омарова С. М., Акаева Ф. С.

Дагестанская государственная медицинская академия,  
Махачкала, Россия

Несмотря на разработку и внедрение в практическое здравоохранение разнообразных высокочувствительных лабораторных методов своевременное выявление условно-патогенных микроорганизмов у больных с хламидийным уретритом смешанной этиологии на ранних стадиях, до развития осложнений остаётся проблемой практического здравоохранения, не нашедшей до настоящего времени окончательного решения.

*Ключевые слова:* хламидии, уретрит, методы диагностики, смешанная этиология.

В настоящее время по-прежнему остается актуальной проблема хламидийных урогенитальных инфекций. Урогенитальный хламидиоз остается одним из самых распространенных в мире заболеваний, передающихся половым путем. В России ежегодно выявляется более 1 млн. больных хламидиозом. *Chlamydia trachomatis*, являясь облигатным внутриклеточным паразитом, вызывает целый ряд заболеваний урогенитального тракта (уретрит), которые нередко протекают бессимптомно, и могут быть выявлены только лабораторными методами. Однако биологические особенности возбудителя хламидиоза значительно ограничивают методологические подходы к его выявлению [1, 3, 4, 5].

Значительную роль в развитии и хламидийных воспалений играет условно-патогенная микрофлора, которая, как правило, осложняет течение основного заболевания. Этиологическая структура осложненных хламидийных уретритов (ХУ) может быть обусловлена разнообразной условно-патогенной микрофлорой: бактерии, уреаплазмы, микоплазмы, грибы, вирусы и другие микроорганизмы. Однако в 20–30% случаев не удается установить агент инфекционно-воспалительного процесса [2, 3, 4, 5].

Меняющийся спектр возбудителей инфекций, рост их антибиотикорезистентности, увеличение числа пациентов из группы риска требуют пристального внимания клиницистов к данной проблеме.

В настоящее время идентификация большинства условно-патогенных возбудителей ХУ основывается на культуральном бактериологическом методе исследования, имеющем ряд недостатков – трудности и большие сроки культивирования. Для более быстрой и качественной индикации и идентификации возбудителей целесообразно использовать методы молекулярно-генетической диагностики. Методы ПЦР (полимеразная цепная реакция) диагностики позволяют в течение нескольких часов выявить состав микрофлоры, минуя стадию культивирования и выделения чистых культур бактерий.

В статье представлены результаты диагностики инфекций, передающихся половым путем у мужчин с уретритами хламидийной и смешанной этиологии. Обследовано 86 мужчин активного репродуктивного возраста с диагнозом неспецифический уретрит.

Образцы ДНК, выделенные из соскобов из уретры у мужчин с диагнозом уретрит, были проанализированы на наличие специфических фрагментов – *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis* и *-genitalium*, *Chlamydia trachomatis*, *Trichomonas vaginalis*, *Neisseria gonorrhoeae*, HCMV, HSV (1 и 2 типов) и HPV (16 и 18 типов) при помощи метода ПЦР. Детекцию ДНК проводили с помощью коммерческих тест-систем фирм «Гентех» и Лабдиагностика (г. Москва).

Одновременно культуральным методом

производили посев мазков из уретры для определения бактериальной микрофлоры. В работе были использованы коммерческие питательные среды производства НПО «Питательные среды» ФГУП «Микроген» (Махачкала).

В результате исследований клинического материала от 86 мужчин с проявлениями неспецифического уретрита в подавляющем большинстве случаев у мужчин встречалась микст-инфекция бактериально-бактериальной, бактериально-вирусной и бактериально-грибковой этиологии. У 58,4% обследованных мужчин выявлялись хламидии, гонококки – у 10%, трихомонады – в 11,6% случаев, уреаплазм – у 11% и микоплазма – в 5% случаев. Наиболее часто среди возбудителей уретрита встречались хламидии в 67,8% случаях, среди ассоциантов выявлялись: *S. aureus* (71%), *K. pneumoniae* (13,7%), *E. coli* в 9,2% случаев. Частота выделения других возбудителей не превышала 6,1%.

Таким образом, в процессе диагностики урогенитальных инфекций, передающихся половым путем, выявлены качественно-количественные ассоциации возбудителей. У мужчин чаще и культуральным и ПЦР методами выявлялись уретриты хламидийной и смешанной этиологии. Пациенты, у которых был выявлен возбудитель только хламидийной инфекции, были обозначены как уретриты хламидийной этиологии. Среди обследованных с таким диагнозом оказалось 17

мужчин. При проведении бактериологического исследования установлено, что почти у всех мужчин были выявлены стафилококки, энтерококки, грибы рода кандиды и другая флора. Так как эти микроорганизмы сами по себе и/или по совокупности могут вызывать воспалительные процессы урогенитального тракта и участвовать в патогенезе заболевания, мы идентифицировали у данных больных как уретриты смешанной этиологии.

Значение урогенитальных хламидиозов в инфекционной патологии человека определяется непосредственными многоочаговыми поражениями мочеполовой системы и их последствиями, влияющими на репродуктивную функцию, а также потенциальной опасностью стать источником хламидийных инфекций другой локализации, в том числе и перинатальных.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Белозоров А.П., Федец О.И., Милютин Е.И., Джораева С.К. Дерматология и венерология. 2001, № 11 (1), С. 42-44.
2. Дмитриев Г.А. Лабораторная диагностика бактериальных урогенитальных инфекций. М., Медицинская книга, 2003, С. 7-9.
3. Михайлов А.В., Гасанова Т.А. ЗППП., 2000, № 2, С. 26-30.
4. Федина Е.Д. Дисс. канд. биол. наук., Москва., 2002.
5. Hisanaga T.L., Laing N.M., De Corby M.- P. et al. *Inf. J. Antimicrob.*, 2005, Nov; 26 (5): 380-8.

#### STUDY OF METHODS FOR DIAGNOSTICS OF CHLAMYDIAL URETHRITIS OF MIXED ETIOLOGY

Muslimov M. O., Omarova S. M., Akaeva F. S.

*Dagestan State Medical Academy, Makhachkala, Russia*

Despite the development and implementation of a variety of highly practical public health laboratory methods timely detection of opportunistic pathogens in patients with chlamydial urethritis of mixed etiology in the early stages, before the development of complications remains a problem of practical public health that has not currently found the final resolution.

*Key words:* chlamydia, urethritis, diagnostic techniques, mixed etiology.

## БИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАММОВ ЛИСТЕРИЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ НА КОММЕРЧЕСКИХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕДАХ ДЛЯ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ ЛИСТЕРИОЗА

Омарова С. М., Исаева Р. И.

Дагестанская государственная медицинская академия, Махачкала, Россия

В статье представлены результаты экспериментальных исследований по изучению влияния условий культивирования, в частности состава питательной среды, на продукцию факторов патогенности листериями. Установлено, что состав разработанных и испытанных питательных сред не влияет на биологические свойства листерий как музейных, так и свежевыделенных штаммов. Показана стабильность сохранения основных биологических свойств *L. monocytogenes* при выращивании в средах для накопления и выделения листерий.

Ключевые слова: листерии, факторы патогенности, питательные среды.

Как известно, продукция листериями факторов патогенности, которые позволяют им активно проникать и размножаться не только в фагоцитах, но и эндотелиальных и эпителиальных клетках, зависит от условий культивирования [3, 4, 5]. При выращивании *in vitro* (на питательных средах) на уровень продукции факторов патогенности влияет состав среды культивирования [1, 2]. Нами испытаны коммерческие питательные среды для накопления и выделения листерий (НПО «Питательные среды»), которые предлагаются для микробиологической диагностики листериоза.

Целью исследования было определение сохранения основных биологических свойств листерий, выделенных на испытанных коммерческих препаратах. Изучены некоторые биологические характеристики *L. monocytogenes* на примере клинического изолята 204 и типовых штаммов 7973 и 10527 (4в). Исследования проводили согласно методам, регламентированным методическими указаниями (МУК 4.2.1122–02) по типированию штаммов листерий на базе лаборатории легионеллеза НИИЭМ им. Н. Ф. Гамалея г. Москва.

Изучение продукции факторов патогенности – гемолизина, лецитиназы, фосфолипазы и каталазы, штаммами листерий, выращенных на изученных средах, показали следующее. Так, определение β-гемолитической активности листерий, являющейся одним из важных

показателей вирулентности штаммов, проводили с использованием 5% кровяного агара. Продукцию гемолизина изучали в опытах при культивировании штаммов *L. monocytogenes* 204 и 4в в среде накопления с последующим титрованием бесклеточных центрифугатов. Установлено, что состав разработанных сред не оказывал влияния на степень экспрессии гемолизина – надосадочные жидкости культуры, полученные с указанных сред и контрольной – триптиказо-соевого бульона (ТСБ), вызывали гемолиз эритроцитов в разведении 1:64. Для штамма 4в такую активность на 3 средах наблюдали в разведении 1:16–1:32.

Определение лецитиназной активности проводили методом культивирования на питательной среде с добавлением лецитина (5% желточной эмульсии) и 0,5% активированного угля. В присутствии активированного угля отмечали четко выраженную лецитиназную активность – в виде плотной зоны помутнения вокруг колоний исследуемых штаммов. На средах без активированного угля лецитиназная активность выражалась слабо или отсутствовала вовсе.

Для изучения вирулентных свойств листерий проводили внутрибрюшинное и внутривенное заражение мышей культурой *L. monocytogenes* 7973. Установлено, что независимо от среды выращивания – среды для накопления, выделения или триптиказо-соевом агаре

(ТСА), динамика гибели животных по дням, а также конечный результат – LD50, были сходны. 50% летальная доза штамма 204 при внутрибрюшинном заражении с использованием среды для накопления составляла  $3,2 \cdot 10^6 \pm 0,3$  м.к., среды для выделения –  $2,4 \cdot 10^6 \pm 0,3$  м.к, контрольная среда (ТСА) –  $3,0 \cdot 10^6 \pm 0,25$  м.к, а при внутривенном инфицировании мышей эти величины были равны  $4,0 \cdot 10^5 \pm 0,2$  м.к,  $3,5 \cdot 10^5 \pm 0,3$  м.к;  $3,0 \cdot 10^5 \pm 0,3$  м.к, соответственно.

При постановке кератоконъюнктивальной пробы на конъюнктиву глаза морской свинки наносили 2 капли испытуемой бульонной культуры, в дозе  $10^2$ - $10^3$  мк/л клинического штамма 204, выращенного на разработанных нами средах. Через 24-48 часа у морской свинки развивался гнойный кератоконъюнктивит, что подтверждало наличие вирулентных свойств у выделенных штаммов в процессе культивирования в разработанных средах. Из гнойного отделяемого конъюнктивального мешка высевалась типичная идентичная с исходной по культуральным и биохимическим свойствам культура *L.monocytogenes*.

В качестве показателя сохранения биологических свойств листерий изучали плазмидные профили ДНК. С целью изучения влияния состава разработанной среды накопления на характеристику плазмидного состава штаммов листерий в сравнении с контрольной средой (ТСБ) использовали метод анализа плазмид в отношении бесплазмидных культур листерий

7973, 4в и плазмидсодержащего клинического изолята 204 *L. monocytogenes*. При анализе образцов ДНК изучаемых штаммов с помощью электрофореза в 0,7% агарозном геле у изолята 204, выращенного на среде накопления, и в контрольной среде ТСБ выявлено стабильное сохранение плазмиды молекулярной массой 30МД. Бесплазмидные штаммы 7973 и 4в не содержали плазмидной ДНК. Таким образом, результаты исследования плазмидного состава штаммов листерий свидетельствуют о том, что разработанные исследуемые среды для накопления и выделения листерий не влияют на состав плазмид у этих бактерий.

Таким образом, коммерческие питательные среды определенного состава для накопления и выделения листерий обеспечивают стабильное сохранение основных биологических свойств, а также некоторых генетических характеристик (плазмидный профиль) изученных культур.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Ермолаева С. А., Белый Ю. Ф., Тартаковский И. С. Молекулярно-генетическая микробиология и вирусология, 2000, 1, С. 17-19.
2. Ермолаева С. А., Тартаковский И. С. Микробиология, 2001, 3, С. 106-110.
3. Зайцева Е. А., Сопов Г. П. ЖМЭИ, 2006, 2, С. 3-6.
4. Тартаковский И. С., Малеев В. В., Ермолаева С. А. М., Медицина для всех, 2002.
5. Ermolaeva S. A., Belyi Yu.F., Tartakovskii I. S. FEMS Microbiol Lett 1999, 174: 137-41.

### BIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF THE STRAINS OF LISTERIA ISOLATED ON COMMERCIAL NUTRIENT MEDIA FOR MICROBIOLOGICAL DIAGNOSTICS OF LISTERIA

Omarova S. M., Isaeva R. I.

*Dagestan State Medical Academy, Makhachkala*

The article presents the results of experimental studies on the effect of culture conditions, in particular the composition of the nutrient medium for production of *Listeria* pathogenicity factors. It was found that the composition of developed and tested culture media does not affect the biological properties of *Listeria* from both a collection and freshly isolated strains. It was demonstrated the stability of the preservation of the basic biological properties of *L. monocytogenes* when grown in media for storage and isolation of *Listeria*.

*Key words:* *Listeria*, pathogenicity factors, culture media.



## ЗНАЧЕНИЕ БЕЛКА Rv0577 ДЛЯ РАННЕЙ ДИАГНОСТИКИ ТУБЕРКУЛЕЗНОЙ ИНФЕКЦИИ

Плеханова М. А.<sup>1</sup>, Аксенова В. А.<sup>2</sup>, Пацула Ю. И.<sup>3</sup>,  
Ткачук А. П.<sup>4</sup>, Лунин В. Г.<sup>4</sup>, Коломеец А. Н.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>ГБОУ ВПО Омский государственный медицинский университет Минздрава России, Омск; <sup>2</sup>НИИ фтизиопульмонологии Первого МГМУ им. И. М. Сеченова, Москва; <sup>3</sup>ФБУН ОмскНИИ Природно-очаговых инфекций Роспотребнадзора, Омск; <sup>4</sup>ГУ НИИ Эпидемиологии и микробиологии имени Н. Ф. Гамалеи, Москва, Россия

С целью оценки ранее изученных белков *M. tuberculosis* (МБТ) в сравнении с недавно идентифицированным белком микобактерий Rv0577 (CFP32B) для диагностики туберкулезной инфекции в исследование был включен 41 ребенок в возрасте до 17 лет. Было проведено специфическое иммунологическое исследование, которое включало определение ИФН- $\gamma$ , после 72 часовой индукции специфическими антигенами, методом ИФА. Показатель ИФН- $\gamma$  после индукции Rv0577 (CFP32B) у пациентов инфицированных МБТ был выше, чем у детей больных туберкулезом ( $p=0,394$ ) и не инфицированных МБТ ( $p>0,06$ ), но достоверно не различался. Не установлена корреляция между показателями ИФН- $\gamma$  индуцированного Rv0577 (CFP32B) и ППД-Л ( $r=0,04$ ), а также гибридным белком ESAT6-CFP10 ( $r=-0,05$ ), при высокой корреляции с показателем после индукции ранним секретиремым белком ESAT6 ( $r=0,80$ ). Результаты исследования позволяют Rv0577 (CFP32B) рассматривать как белок ранней стадии туберкулезной инфекции, при этом он мало информативен для оценки латентной и активной туберкулезной инфекции.

**Ключевые слова:** иммунодиагностика, туберкулезная инфекция, дети.

В настоящее время большой интерес представляет изучение иммуногенности различных антигенов *M. tuberculosis* (МБТ) у больных активным туберкулезом. Среди нескольких групп антигенов МБТ центральное место занимают секретиремые белки [5]. К ранним секретиремым белкам относятся белок ESAT6 (Rv3875) и белок CFP10 (Rv3874), которые распознаются на ранней стадии туберкулезной инфекции и способствуют пролиферации лимфоцитов, ответственных за продукцию интерферона гамма (ИФН- $\gamma$ ) – основного фактора протективного иммунитета [1]. Данные белки на сегодняшний день считаются наиболее изученными.

Недавно у лиц, инфицированных МБТ, был обнаружен секретиремый белок Rv0577 (CFP32B), который присутствует только у микобактерий туберкулезного комплекса (МТК) [3]. В настоящее время роль белка до конца не определена. По результатам иммуноферментного анализа (ИФА) белок Rv0577 (CFP32B) выявлялся у 56% больных туберкулезом, его уровень коррелировал с концентрацией интерлейкина (ИЛ)-10 и не показывал корреляции с уровнем ИФН- $\gamma$  [3, 4]. Результа-

ты другого исследования показали, что Rv0577 (CFP32B), взаимодействуя с TLR2, активировал Т-клетки, секретирующие ИФН- $\gamma$  и ИЛ-2, что может способствовать формированию Th1-иммунного ответа и развитию эффекторных Т-клеток памяти [2]. Таким образом, несмотря на проводимые исследования по антигену Rv0577 (CFP32B), данные весьма противоречивы, что указывает на необходимость его дальнейшего изучения.

**Цель исследования:** оценка ранее изученных белков микобактерий туберкулеза (ППД-Л, гибрид ESAT6-CFP10, ESAT6) в сравнении с недавно идентифицированным белком микобактерий Rv0577 (CFP32B) для диагностики туберкулезной инфекции.

**Материалы и методы.** В исследование был включен 41 ребенок в возрасте от 1 года до 17 лет, из них 61% детей (25) с подтвержденным диагнозом туберкулеза (группа «ТБ»). Среди детей больных туберкулезом в 24% (6) установили инфильтративную форму, в 4% (1) диссеминированную, в 32% (8) первичный туберкулезный комплекс и в 40% (10) туберкулез внутригрудных лимфатических узлов. В ам-

булаторных условиях было обследовано 39% детей (16), из них 31,3% пациент (5) не был инфицирован МБТ (группа «НТ»), при этом в 18,7% (3) установили поствакцинальную аллергию и 68,7% пациентов (11) были инфицированы МБТ (группа «Т»).

Диагноз туберкулеза основывался на результатах клинических, лабораторных, лучевых методов, туберкулинодиагностики и пробы с Диаскинтестом. Дополнительно всем детям было проведено специфическое иммунологическое исследование, которое включало определение ИФН- $\gamma$ , после 72 часовой индукции специфическими антигенами (ППД-Л, гибрид ESAT6-CFP10, ESAT6, Rv0577 (CFP32B)), методом ИФА. Оценку уровня специфического ИФН- $\gamma$  проводили в пг/мл. Полученные данные обрабатывались с использованием статистических программ Statistica 6,0 и Biostat. На проведение данного исследования получено разрешение этического комитета. Для участия детей в иммунологическом исследовании от родителей или их законных представителей было получено добровольное информированное согласие.

**Результаты.** Средний возраст детей, включенных в исследование, составил  $6,9 \pm 0,7$  лет. Из социально-неблагополучных семей в основном были дети с установленным диагнозом туберкулеза, при этом 40% (10) из социально-дезадаптированных и 28% (7) из социопатических ( $\chi^2=14,698$ ,  $p=0,005$ ), также чаще эти дети были из семейного 48% (12) ( $\chi^2=10,971$ ,  $p=0,015$ ) и бациллярного 56% (14) ( $\chi^2=11,338$ ,  $p=0,013$ ) очага туберкулеза. Среди детей из группы «Т» чаще регистрировали отягощенный аллергологический анамнез 72,7% (8) ( $\chi^2=16,331$ ,  $p=0,001$ ), частые респираторные заболевания 54,5% (6) ( $\chi^2=9,737$ ,  $p=0,027$ ).

Среди детей из группы «ТБ» (14 мм; 10:18), уровень чувствительности к туберкулину (ППД-Л) был достоверно выше, чем среди детей групп «Т» (9,8 мм; 7:13,  $p=0,016$ ) и «НТ» (2,6 мм; 0:0,  $p=0,005$ ). Результаты пробы Манту с 2 ТЕ ППД-Л, также достоверно различались в группах «Т» и «НТ» ( $p=0,042$ ). Определяя чувствительность к диаскинтесту, установили статистически значимые различия по уровню ответа среди детей из исследуемых групп: «ТБ» (14,8 мм; 14:18), «Т» (1,5 мм; 0:0) и «НТ» (0 мм) ( $p<0,0001$ ). Не было значимых различий по уровню чувствительности к диаскинтесту у детей из групп «Т» и «НТ» ( $p=0,385$ ).

Оценивая иммуногенность специфических антигенов, установили высокий уровень продукции ИФН- $\gamma$  после индукции ППД-Л среди детей группы «ТБ» 661,9 пг/мл (159:1010), который статистически значимо отличался от показателей в группах «Т» 95 пг/мл (15,6:122,  $p=0,001$ ) и «НТ» 29,6 пг/мл (0:0,  $p=0,014$ ). При индукции гибридным белком (ESAT6-CFP10), также установили статистически значимые различия между показателями ИФН- $\gamma$  детей из группы «ТБ» 90 пг/мл (6:131) и групп «Т» 0,1 пг/мл (0:0,  $p=0,003$ ), «НТ» 0 пг/мл ( $p=0,043$ ) и отсутствие различий между показателями в группах «Т» и «НТ». Полученные результаты индукции, свидетельствовали о высокой информативности данных антигенов только для оценки активной туберкулезной инфекции. Уровень ИФН- $\gamma$  после индукции белком ESAT6 был выше среди детей группы «Т» 65,9 пг/мл (3,5:75) и статистически значимо различался с показателями детей из групп «ТБ» 14,5 пг/мл (0:19,  $p=0,025$ ) и «НТ» 14 пг/мл (0:0,  $p=0,043$ ), что подтверждало информативность ESAT6 в качестве белка ранней стадии туберкулезной инфекции. Также установили высокий уровень ИФН- $\gamma$  после индукции белком Rv0577 (CFP32B) у пациентов, инфицированных МБТ 38,5 пг/мл (1:52,5), который статистически значимо не различался от показателей детей из групп «ТБ» 14,9 пг/мл (0:31,  $p=0,394$ ) и «НТ» 11 пг/мл (0:0,  $p>0,06$ ). У пациентов из группы «ТБ» с прогрессированием туберкулезного процесса показатель был ниже (2,6 пг/мл; 0:5), чем у больных без прогрессирования заболевания (21,5 пг/мл; 0:38), но статистически был не значим ( $p=0,200$ ). Не установили корреляции между показателями ИФН- $\gamma$  индуцированного Rv0577 (CFP32B) и ППД-Л ( $r=0,04$ ), и также гибридным белком ESAT6-CFP10 ( $r=-0,05$ ). При этом определялась прямая зависимость между уровнем ИФН- $\gamma$  после индукции белком ESAT6 и Rv0577 (CFP32B) ( $r=0,80$ ).

**Выводы.** Таким образом, Rv0577 (CFP32B) можно рассматривать как белок ранней стадии туберкулезной инфекции, но он малоинформативен в качестве специфического антигена для оценки как латентной, так и активной туберкулезной инфекции у детей.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Brodin P. et al. // Trends Microbiol. 2004. № 12. P. 500-508.

2. Byun E. – H. et al. // FASEB J. 2012. V. 26. P. 2695-2711.
3. Huard R. C. et al. // Infect. Immun. 2003. V. 71. P. 6871-6883.
4. Moser M., Murphy, K. M. // Nat. Immunol. 2000. № 1. P. 199-205.
5. Mustafa A. S. et al. // Clin. Exper. Immunol. 2002. V.130. № 1. P. 37-42.

## THE VALUE OF RV0577 PROTEIN FOR EARLY DIAGNOSTICS OF THE TUBERCULOSIS INFECTION

**Plekhanova M.A.<sup>1</sup>, Aksenova V.A.<sup>2</sup>, Patsula Yu.I.<sup>3</sup>,  
Tkachuk A.P.<sup>4</sup>, Lunin V.G.<sup>4</sup>, Kolomeets A.N.<sup>3</sup>**

*<sup>1</sup>PBEIHE Omsk State Medical University of the Russian Ministry of Health, Omsk; <sup>2</sup>SRI of a Phthisiopulmonology of I. M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow; <sup>3</sup>FBIS Omsk SRI of Zoonotic Infections of the Federal Service on Customers' Rights Protection Surveillance, Omsk; <sup>4</sup>SI of SRI of N. F. Gamalei of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia*

With the purpose of an assessment of earlier studied MBT proteins in comparison with recently identified protein of micobacteria of Rv0577 (CFP32B) for the diagnostics of tuberculosis infection the research included 41 children up to 17 years. To all children the specific immunological research was carried out which included the definition of IFN- $\gamma$  after the 72 h induction by specific antigens. After the induction of Rv0577 (CFP32B) patients with the MBT had the IFN- $\gamma$  indicator above that in children with tuberculosis ( $r=0,394$ ) and those not infected with MBT ( $p>0,06$ ), but these values did not reliably differ. Correlation between the indicators of IFN- $\gamma$  of the induced Rv0577 (CFP32B) and PPD-L ( $r=0,04$ ), and also hybrid ESAT6-CFP10 protein ( $r= -0,05$ ) was not established, at high correlation with an indicator after the induction with early secreted ESAT6 protein ( $r=0,80$ ). Thus, Rv0577 (CFP32B) can be considered as protein of an early stage of a tuberculosis infection, but it is low-informative as a specific antigen for an assessment of a latent and active tuberculosis infection.

## ПРОБЛЕМЫ КОНТРОЛЯ НАД КОЛЛЕКТИВНЫМ ИММУНИТЕТОМ К КОКЛЮШУ

**Раев М. Б.<sup>1,2</sup>, Храмцов П. В.<sup>1,2</sup>, Бочкова М. С.<sup>1</sup>,  
Тимганова В. П.<sup>1</sup>**

*<sup>1</sup>ФГБУН Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН; <sup>2</sup>Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия*

Исследована возрастная иммуноструктура противокклюшного иммунитета у детей до 17 лет ( $n=135$ ) г. Перми при помощи агглютинационного теста и ИФА на антитела к коклюшному токсину (КТ). Продемонстрирована низкая эффективность ИФА как метода серологического контроля противокклюшного иммунитета при использовании цельноклеточной вакцины. У детей дошкольного возраста наблюдается снижение иммунитета к коклюшу по результатам реакции агглютинации. Возрастание титров антител к КТ у старших школьников свидетельствует о скрытой циркуляции возбудителя в популяции.

*Ключевые слова:* коллективный иммунитет, коклюш, протективный титр антител.

В настоящее время, как в нашей стране, так и в мире имеет место существенная недооценка заболеваемости коклюшем [1]. В последние годы происходит так называемое «возвращение» коклюша в целом ряде стран мира: Эсто-

нии, США, Иране, Соединенном Королевстве, Испании и т.д. В 2007 г. Cortese с соавт. на основе анализа тематических публикаций из базы данных MEDLINE сделала вывод о том, что реальная заболеваемость коклюшем в США

превышает данные официальной статистики более чем в 25 раз [2]. Кроме того, было продемонстрировано, что приблизительно в 20% случаев клинические признаки болезни не регистрируются в качестве основы для постановки диагноза коклюша. Один из ведущих мировых специалистов по эпидемиологии и вакцинопрофилактике коклюша J. Cherry высказал предположение, что текущая заболеваемость может быть в 40-160 раз выше той, которая приводится в официальных данных. По его мнению, значительную долю больных составляют дети старшего возраста и взрослые, у которых коклюш протекает бессимптомно, либо с нетипичной для коклюша клинической картиной. Именно такие больные составляют источник для заражения не вакцинированных детей. В ряде работ отмечается скрытая циркуляция возбудителя коклюша среди детей старшего возраста и взрослых.

Очевидно, что текущая заболеваемость коклюшем в РФ 3,27 на 100 тыс. чел., приводимая официальными источниками, является заниженной. Такого мнения придерживается В.К. Таточенко, назвавший коклюш «недоуправляемой инфекцией». Он основывает свои выводы на сравнении данных заболеваемости коклюшем в различных регионах: в Московской обл. и городе Санкт-Петербурге показатели заболеваемости значительно превышают общероссийские, а в ряде регионов случаев коклюша не отмечено вовсе. Подобную противоречивую картину можно видеть и на примере отдельных областей. Так, в Пермском крае в 2013 г. случаи коклюша были отмечены лишь в четырех районах. Причем в Горнозаводском районе заболеваемость составила 58 на 100 тыс. чел., что выше областного показателя в 48 раз! В масштабах страны Таточенко объясняет подобное явление разницей в эффективности используемых методов диагностики. Наибольшие показатели заболеваемости характерны для Москвы и Санкт-Петербурга, где  $\frac{3}{4}$  диагнозов верифицируются лабораторными методами, в частности ПЦР [1]. По данным Куровой с соавт. [3] 32% от всех зарегистрированных в последнее десятилетие случаев коклюша в России приходится на Москву и Санкт-Петербург, где проживает лишь 10% всего населения страны.

Приведенные данные заставляют обратить пристальное внимание на систему оценки эффективности вакцинопрофилактики коклюша. Показатели охвата детского населения привив-

ками против коклюша (>97% в большинстве регионов) не отражают состояние коллективного иммунитета к коклюшной инфекции. Число серопозитивных по отношению к коклюшу лиц в настоящее время остается неприемлемо низким (<50%) в целом ряде регионов. Контроль напряженности противокклюшного иммунитета производится преимущественно при помощи реакции агглютинации (РА) в единственной возрастной группе детей 3–4 лет [4]. Таким образом, информация о состоянии иммунитета к инфекции среди детей дошкольного и школьного возраста является весьма скудной и доступна она лишь из нерегулярных исследований. Другой важной проблемой является использование ИФА для контроля противокклюшного иммунитета. В методических указаниях [4] не регламентируется, какие иммуноферментные наборы должны использоваться для анализа, а это является ключевым вопросом при серологических исследованиях. В настоящее время согласно рекомендациям Всемирной Организации Здравоохранения корреляция титров антител с защитой от коклюша показана лишь для РА. Протективный антиген или комплекс протективных антигенов для коклюшной инфекции не выявлен, нет единого мнения о защитном вкладе антител к тому или иному антигену. Вследствие этого встает вопрос о корректности применения ИФА для контроля над противокклюшным иммунитетом. Особенно важен он в свете имеющихся данных о том, что спектр поствакцинальных антител к различным антигенам коклюшного микроба (коклюшному токсину [КТ], пертактину, филаментозному гемагглютиниону) значительно различается при использовании разных цельноклеточных вакцин.

Целью работы являлась сравнительное исследование возрастной структуры поствакцинального иммунитета у детей г. Перми при помощи двух методов анализа: РА и ИФА.

**Методы. Контингент.** Из ГДКП № 5, г. Перми были получены 135 образцов сывороток венозной крови детей в возрасте от 2 недель до 17 лет включительно. Все дети были вакцинированы цельноклеточными отечественными вакцинами АКДС или БУБО согласно Национальному календарю прививок и не имели диагноза «коклюш» в анамнезе. Сыворотки крови хранили при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Все дети, участвующие в эксперименте, были разбиты на 6 возрастных групп: 2 не-

дели – 3 месяца (предвакцинальная группа, «НВ»), 6 – 18 месяцев (3 дозы вакцины, «В»), 18 месяцев – 3,5 года (1-2 года после ревакцинации, «РВ-1»), 6,5 – 7,5 лет (5-6 лет после ревакцинации, «РВ-5»), 11,5 – 12,5 лет (10-11 лет после ревакцинации, «РВ-10»), 16 – 17 лет (15-16 лет после ревакцинации, «РВ-15»). Число детей в соответствующих группах было следующим: 20, 15, 28, 27, 23 и 22.

Титры агглютининов измеряли при помощи набора производства «ЭКОЛАБ» (Россия). Количественно антитела к коклюшному токсину в ИФА определяли при помощи набора фирмы «Euroimmun» (Германия). Соответствующий набор был выбран, поскольку большинство авторов признает протективную роль антител к коклюшному токсину, к тому же он является единственным антигеном *Bordetella pertussis*, входящим в состав всех ацеллюлярных коклюшных вакцин.

Для каждой группы были рассчитаны средние геометрические титров (СГТ) гемагглютининов. Нулевые титры в ходе статистической обработки выражали как титр 1:5 (половина от минимального предела детекции набора). В дальнейшем все полученные титры антител для удобства статистической обработки логарифмировали по формуле  $t = \log_2(1 \div \text{Титр})$ .

Данные по содержанию антител к КТ в возрастных группах охарактеризовали при помощи методов описательной статистики. Сравнение содержания антител в группах производили при помощи парного t-критерия Стьюдента и U-теста Манна-Уитни. Статистическую обработку данных проводили в программе Статистика 10.0.

**Результаты и обсуждение.** Средние значения концентраций антител к КТ составили 13,4 (95% доверительный интервал: –1,8–28,8) МЕ/мл для группы «НВ», 4,7 (1,1–8,4) МЕ/мл для группы «В», 3,2 (0,8–5,6) МЕ/мл для группы «РВ-1», 3,5 (–1,4–8,5) МЕ/мл для группы «РВ-5», 33,9 (10,3–57,5) МЕ/мл для группы «РВ-10», 22,3 (6,6–38,1) МЕ/мл для группы «РВ-15». Группы сравнили попарно при помощи теста Манна-Уитни, достоверное различие было продемонстрировано лишь между группами «РВ-5» и «РВ-10», что соответствует дошкольному и среднему школьному возрасту. Таким образом, было продемонстрировано, что вакцинация и ревакцинация цельноклеточной коклюшной вакциной не отразилась на уровне антител к коклюшному токсину у детей (от-

сутствие достоверных различий между группами «НВ», «В» и «РВ-1»).

По результатам РА для каждой исследованной группы были рассчитаны СГТ: в группе «Н» 1:9, в группе «В» 1:80, в группе «РВ-1» 1:160, в группе «РВ-5» 1:60, в группе «РВ-10» 1:114, в группе «РВ-15» 1:80. После логарифмирования титров агглютининов нормальное распределение было получено во всех группах, кроме группы не вакцинированных детей. Последовательное сравнение титров антител в возрастных группах проводили при помощи теста Стьюдента, за исключением сравнения групп «Н» и «В», для сравнения которых применили критерий Манна-Уитни. Результаты сравнения упомянутых групп продемонстрировали достоверные различия между титрами антител у не вакцинированных и вакцинированных детей, а также между группами «РВ-1» и «РВ-5». Таким образом, вакцинация детей цельноклеточной вакциной приводит к достоверному увеличению уровня агглютининов, достоверное снижение титра происходит у детей спустя 5 лет после ревакцинации.

Полученные результаты наглядно демонстрируют низкую эффективность использования ИФА к КТ для контроля поствакцинального иммунитета в нашей стране, где для иммунизации применяется цельноклеточная коклюшная вакцина. Как уже было сказано, спектр антигенов, к которым вырабатываются антитела при вакцинации цельноклеточными вакцинами, различен. Он зависит от производителя вакцины, это обуславливает необходимость проведения локальных исследований гуморального ответа на вакцины местных производителей. Данные для них могут различаться с теми, что были получены для аналогичных вакцин в других странах. Сравнение данных с результатами других исследований, в частности с работой Куровой с соавт. [3] свидетельствует о важности выбора набора для постановки ИФА на антитела к коклюшу. В упомянутой работе было продемонстрировано достоверное увеличение противокклюшных антител после вакцинации при помощи ИФА-теста на антитела к смеси КТ и ФГА. Это вполне соответствует данным, о том, что цельноклеточные коклюшные вакцины способствуют выработке антител к ФГА и фимбриям в большей степени, чем к КТ. На первый взгляд применение подобных наборов в таком случае может быть оправдано, однако неспособность их оценить уровень

защищенности обесценивает полученные при их помощи данные об уровне антител. В настоящее время РА остается единственным показательным инструментом исследования противокклюшных антител при использовании цельноклеточных вакцин.

Результаты работы заставляют помимо всего прочего обратить внимание на снижение титров агглютининов у детей дошкольного возраста и увеличение концентрации антител к КТ в группах школьников. Эти данные свидетельствуют об угасании противокклюшного иммунитета и подтверждают наличие скрытой циркуляции возбудителя среди школьников. В этой ситуации логичным выглядит принятие мер по снижению заболеваемости школьников, например введением в Национальный календарь прививок дополнительной дозы вакцины, на этот раз уже бесклеточной [1],

а также усиление контроля за состоянием противокклюшного иммунитета у детей дошкольного возраста (6–7 лет) и старших школьников.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Таточенко В. К. Коклюш – «недоуправляемая инфекция» // Вопросы современной педиатрии – № 2–2014. – С. 78–82.
2. Cortese, M. et al. A “New Age” in Pertussis Prevention: New Opportunities Through Adult Vaccination // American Journal of Preventive Medicine. – V. 32. – Is. 3. – 2007. – P. 177–185.
3. Курова Н. Н., Ценева Г. Я., Жебрун А. Б. Противокклюшный иммунитет у детей в городах Северо-Западного федерального округа с разной численностью населения // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – № 4. – 2013. – С. 33–37.
4. МУ 3.1.2943-11

### ISSUES OF CONTROL OVER THE COMMUNITY IMMUNITY TO PERTUSSIS

Rayev M. B.<sup>1,2</sup>, Khramtsov P. V.<sup>1,2</sup>, Bochkova M. S.<sup>1</sup>, Timganova V. P.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>FSBSI Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms UB RAS; <sup>2</sup>FSBEI HPE Perm State National Research University, Perm, Russia

Age-specific immunostructure of anti-pertussis immunity was analyzed in the city of Perm in children up to 17 years (n=135) using agglutination test and IEA for antibodies to pertussis toxin (PT). Low IFA efficacy as a method for serological control of anti-pertussis immunity in immunization with whole cell vaccine was demonstrated. As a result of agglutination test children of preschool age demonstrated the decrease in immunity to pertussis. Elevation of antibody titers against pertussis toxin observed in elder pupils evidences for latent pathogen circulation in population.

### ДИАГНОСТИКА ПИЩЕВОЙ ГИПЕРЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ, ОПОСРЕДОВАННОЙ ИММУНОПАТОЛОГИЧЕСКИМИ РЕАКЦИЯМИ III ТИПА

Розенштейн А. З.<sup>1</sup>, Розенштейн М. Ю.<sup>1</sup>, Кондаков С. Э.<sup>2</sup>, Черевко Н. А.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Клиника ImmunoHeath, Нью-Йорк, США; <sup>2</sup>МГУ, Москва, <sup>3</sup>СибГМУ, Томск, Россия

Предложен новый методологический подход к обработке и интерпретации данных от многокомпонентного ELISA IgG. Показана корректная возможность определения критерия «норма-патология» на основе исследования вида функции распределения плотности вероятности «IgG иммунных откликов» в «IgG иммунном ответе». Показана возможность унифицированной диагностики специфической гиперчувствительности III типа у пациентов с различными уровнями «пищевой дезадаптации» и симптомов патологических реакций на пищевые антигены.

**Ключевые слова:** иммуноферментный анализ, иммуноглобулин G, иммунопатологические реакции III типа, пищевая дезадаптация.

В последние годы отмечается возросший научный и клинический интерес к IgE-независимой пищевой гиперчувствительности, опосредованной иммунопатологическими реакциями III типа. Актуализируется роль контроля иммунной системы в обеспечении толерантности на пищевые антигены и судьба иммунных комплексов в составе пищевого антигена со специфическими IgG1, IgG2, IgG3 антителами. Становится принципиальной проблема пересмотра особенностей патогенеза заболеваний, опосредованных иммунопатологическими реакциями III типа, с признанием участия иммунокомплексной пищевой антигенной нагрузки.

Целью настоящей работы является обоснование корректного подхода к решению проблемы диагностики IgE-независимой пищевой гиперчувствительности, опосредованной иммунопатологическими реакциями III типа, на основе строгого рассмотрения физической модели эксперимента с базовым тестом ELISA IgG [1,2].

Мы предполагаем, что изменение концентрации специфических IgG можно описывать как иммунный ответ организма при периодическом попадании антигена в организм или при постоянной антигенной нагрузке, изменяющейся во времени. Основным отличием ELISA IgG от аналогичных тестов, является принцип формирования тест системы с набором пищевых антигенов, который в тест-системе для ELISA IgG содержит представительную выборку пищевых антигенов размером N, полученную из генеральной совокупности антигенов размером N<sub>0</sub>, характеризующей конкретную пищевую среду. Физически, тест ELISA IgG является априорно многокомпонентным тестом и представляет собой набор из N «элементарных» (ИФА) n тестов от N ( $1 \leq n \leq N$ ) лунок тест-системы, где N – количество тестируемых антигенов, равное размеру представительной выборки. Корректный подход к обработке данных эксперимента основан на предположении, что реакция на каждый n-й антиген независима от другого и скорость выработки антител к каждому антигену постоянна и не отличается в пределах эксперимента. Результат теста, вследствие детерминированности набора тестируемых пищевых антигенов, состоящий из связанных между собой логикой формирования тест системы «(IgGi) n иммунных откликов» (n- индекс ан-

тигена, i-индекс специфического G антитела), должен рассматриваться как цельный персонафицированный «(IgGi) n иммунный ответ». Результат представляет собой интегральную ответную реакцию иммунной системы человека, отождествляемую с результатом взаимодействия *in vitro* сыворотки крови с N различными антигенами. Каждый элементарный «(IgGi) n иммунный отклик», определяемый в эксперименте с ИФА через величину оптической плотности для n-й лунки тест системы, пропорционален не общей концентрации IgG, а концентрации специфических к n-му антигену-(АГ)n антител-(АТ)i в составе иммунных комплексов, образованных на базе прореагировавших пар «(АГ)n – «(АТ)i» [3]. Именно величина концентрации специфических антител (IgG) i в составе иммунных комплексов, а не величина концентрации общего IgG, является измеряемой величиной в диагностике иммунопатологических реакций III типа на основе ELISA IgG. При этом концентрация общих IgG в образце сыворотки крови конкретного пациента, может варьироваться в широком диапазоне величин [4].

Методология эксперимента с ELISA IgG базируется на априорном предположении о корреляции величины измеряемой концентрации специфических антител (IgG)i с уровнем гиперчувствительности III типа к тестируемому n-му антигену. На основании теории статистических методов обработки результатов экспериментов, предложена физически и математически корректная методология нахождения критерия «норма-патология» на основе исследования вида функции распределения плотности вероятности (ФРПВ) «(IgGi)n иммунных откликов» по шкале измерений [5].

Характерная структура ФРПВ «(IgGi)n иммунных откликов», полученная при тестировании представительной выборки пациентов с различными типами тест-систем, позволяет предположить, что иммунная система человека в подавляющем большинстве случаев относительно слабо реагирует на различие в физико-химических и «аллергенных» свойствах большинства пищевых антигенов из толерантной пищевой среды обитания. Этот, статистически достоверно регистрируемый эффект, проявляется в виде наличия сплошной части спектра ФРПВ «(IgGi)n иммунных откликов», сосредоточенной в области малых значений амплитуд иммунных реакций.

И только ряд пищевых антигенов вызывает строго персонифицированные аномальные реакции, проявляющиеся в виде дискретных аномальных откликов в спектре ФРПВ, расщепленных по всей шкале измерений.

Эта закономерность наблюдается для любых типов тест систем ELISA IgG с различным, методологически корректно составленным, статистически представительным набором пищевых антигенов. Определение критерия «норма-патология» и нахождение «продуктов-антагонистов» сводится при этом к выявлению совокупности антигенов, «образующих» ансамбль дискретных откликов ФРПВ, или аномальную область вариационного ряда «(IgGi) n иммунных откликов», которая всегда адекватно соответствует области с аномальными дискретами в ФРПВ [1,2].

Нахождение списка «продуктов-антагонистов» по результатам ELISA IgG, является необходимым, но недостаточным критерием построения корректной и эффективной «элиминационной диеты». Последующим и достаточным критерием является выявление персонифицированных «кластеров пищевой интолерантности» пациента, определяющих конкретный характер гиперчувствительности III типа. Анализ подобных «кластеров» дает возможность обосновать персонифицированную «элиминационную диету» и ввести режим «антигенного щажения» на период естественного катаболизма специфических IgG (до 3-4х месяцев). Профессионально подготовленный врач должен сопоставить результаты тестов, и в наблюдаемый период пациента вернуть в адаптивную пищевую среду.

Исследование динамики ФРПВ для пациентов с различными симптомами заболеваний, ассоциированных с иммунопатологическими реакциями III типа, показало, что спектр ФРПВ с минимальным количеством аномальных откликов характерен для пациентов с минимальным уровнем воспаления III типа. Сопоставление вида ФРПВ с анамнезами представительной выборки пациентов, позволило предположить существование статистически достоверной корреляции между степенью диссипации сплошного спектра в ФРПВ и степенью выраженности воспаления III типа у конкретного пациента к тестируемому набору пищевых антигенов. На основании исследования представительной выборки результатов тестирования ELISA IgG были сделаны следующие **выводы**:

1. вид ФРПВ «(IgGi)n иммунных откликов», или соответствующего ей ранжированного ряда вариантов «(IgGi)n иммунных откликов», уникален и персонифицирован для каждой иммунной системы конкретного человека;

2. содержит необходимую и достаточную информацию для физически и математически корректного определения критерия «норма-патология» и может играть роль специфического маркера степени выраженности гиперчувствительности III типа по IgG признаку;

3. исследование отдельных «(IgGi)n иммунных откликов» или их комбинаций вне «(IgGi)n иммунного ответа», внесение артефактных референтных значений, «зональных моделей», или искусственно вводимых уровней селекции для определения критерия «норма-патология», бессмысленно с физической точки зрения, некорректно с математической и может приводить к существенным ошибкам в определении персонифицированного набора «продуктов-антагонистов» и составлении эффективной «элиминационной диеты» по результатам ELISA IgG.

Таким образом, использование предложенной методологии в обосновании «элиминационной диеты», с клинической точки зрения, позволяет существенно снизить или элиминировать избыточную антигенную нагрузку на иммунную систему и сформировать щадящий персонифицированный режим, способствующий восстановлению иммунологического гомеостаза. Предлагаемая физическая модель эксперимента с многокомпонентным ELISA (IgGi)n» и методологический подход к обработке данных могут служить основой для унифицированной корректной диагностики гиперчувствительности III типа к пищевым антигенам вне зависимости от концентрации общих IgG в момент проведения измерений.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Розенштейн М. Ю., Ихалайнен Е. С., Кондаков С. Э. и др. Вестник Моск. Ун-та, Сер 2, Химия 2011, Т 52, № 3, с 230-236.
2. Rozeshteyn A. Z., Rozenshteyn M. Y., Volkov A. V. «Method of Analysis, Detection and Correction of Food Intolerance in Humans», WO 2009/035529 A1.
3. Егоров А. М., Осипов А. П., Дзантиев Б. Б., Гаврилова Е. М., Теория и практика иммуноферментного анализа. М, Высшая школа, 1991, 288 с.
4. Белых Л. Н., Марчук Г. И. Анализ математических моделей в иммунологии. М.: Наука, 1988. 192 с.
5. Бендат Д., Пирсол А. Прикладной анализ случайных данных. М.: «Мир», 1989, 540 с



## DIAGNOSIS OF FOOD HYPERSENSITIVITY MEDIATED THROUGH TYPE III IMMUNOPATHOLOGICAL REACTIONS

<sup>1</sup>Rosenstein A. Z., <sup>1</sup>Rosenstein M. Yu., <sup>2</sup>Kondakov S. E., <sup>3</sup>Cherevko N. A.

<sup>1</sup>ImmunoHeath Clinic, New York, USA; <sup>2</sup>Moscow State University, Moscow, <sup>3</sup>SSMU, Tomsk, Russia

A new methodological approach to processing and interpretation of multicomponent ELISA IgG data is presented. The possibility of determining the correct criterion of “norm-pathology” based on a study of the form of the distribution function of the probability density of “IgG immune responses” in “IgG immune reaction” is demonstrated. The possibility of a unified diagnostics of a specific type III hypersensitivity in patients with different levels of “food disadaptation” and symptoms of pathological reactions to food antigens is shown.

---

---

## ДИНАМИКА СПЕЦИФИЧЕСКИХ IgG К ПИЩЕВЫМ АНТИГЕНАМ, КАК ПЕРСониФИЦИРОВАННЫЙ МАРКЕР СОСТОЯНИЯ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ ЧЕЛОВЕКА

Розенштейн М. Ю.<sup>1</sup>, Розенштейн А. З.<sup>1</sup>, Кондаков С. Э.<sup>2</sup>,  
Черевко Н. А.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Клиника ImmunoHeath, Нью-Йорк, США; <sup>2</sup>МГУ, Москва, <sup>3</sup>СибГМУ, Томск, Россия

Выявлены статистически достоверные закономерности в динамике специфических «(IgG)п иммунных ответах» до и после «элиминационной диеты», позволяющие находить корреляции между характеристиками специфических «(IgG)п иммунных ответов» и клиническо-иммунологической эффективностью лечения «элиминационной диетой». Предложен новый подход в оценке иммунореабилитации и обосновании персонифицированной «элиминационной диеты», как метода антигенной разгрузки в лечение ряда заболеваний, обусловленных иммунопатологическими реакциями III типа.

*Ключевые слова:* иммунопатологические реакции III типа, ELISA IgG, элиминационная диета, гиперчувствительность III типа.

По современным представлениям иммунопатологические реакции III типа (гиперчувствительность III типа) развиваются к антигенам недорасщепленных до мономеров пищевых белков, в случаях их активного трансцитоза на фоне высокой проницаемости эпителиального барьера кишечника. Реакции III типа являются частью защитных реакций иммунной системы, поддерживающих элиминацию антигена любого происхождения в составе иммунных комплексов со специфическими антителами субклассов IgG. В ситуации, когда некоторое критическое количество пищевых антигенов попадает в кровь постоянно, концентрация образующихся циркулирующих и фиксированных иммунных комплексов может достигать уровня, при котором физиологиче-

ские системы выведения не справляются с избыточной антигенной нагрузкой. В результате возникает хроническая рециркуляция средне- и низкомолекулярных иммунных комплексов, которые фиксируются посредством специфических FcR к IgG на клетках тканей – мишеней и могут вызывать локальные воспалительные процессы, являющиеся потенциальной причиной возникновения ряда системных хронических иммунокомплексных заболеваний, связанных с поражением сосудов, суставов, паренхиматозных органов, тканей нервной системы, кожи.

Эффективным методом снятия избыточной антигенной пищевой нагрузки является обоснованная «элиминационная диета», построенная по результатам теста ELISA IgG [1]

и предполагающая персонифицированное исключение ряда «продуктов-антагонистов» из рациона пациента [2]. Однако до настоящего времени не существовало методологического инструмента, позволяющего количественно и качественно оценить клинико-иммунологическую эффективность назначаемой персонифицированной «элиминационной диеты».

**Цель настоящей работы:** поиск и обоснование статистических корреляций в динамике «IgG иммунных ответов» на пищевые антигены, позволяющих оценить клинико-иммунологическую эффективность «элиминационной диеты», составленной на основе результатов многокомпонентного ELISA IgG.

Для проведения исследований была взята статистически представительная выборка динамических результатов тестов пациентов ( $M \gg 1000$ ) в РФ, США и ЕС различных этнических групп, полов и возрастных категорий, соблюдающих принципы рекомендованной «элиминационной диеты» в течение 4-х месяцев. По результатам первичного и повторного тестирования, был проведен статистический сравнительный анализ следующих характеристик «(IgGi)n иммунных ответов» до и после «элиминационной диеты»:

- дискретных вариационных рядов специфических «(IgGi)n иммунных откликов», полученных при первичном и вторичном тестировании,
- графических образов «(IgGi)n иммунных ответов», представленных в виде огибающих вариационных рядов «(IgGi)n иммунных откликов», совмещенных на одном графике в координатах «индекс продукта – (IgGi)n иммунный отклик»,
- графических образов «(IgGi)n иммунных ответов», представленных в виде функций распределения плотности вероятности (ФРПВ) «(IgGi)n иммунных откликов» по шкале измерения в координатах «величина ФРПВ – амплитуда иммунного отклика» ( $n$  – индекс антигена,  $i$  – индекс специфического G антитела).

Анализ характерных и типичных результатов подобных сравнений для представительной статистической выборки повторных ELISA IgG тестов, позволил разработать следующие методологические приемы оценки эффективности используемой «элиминационной диеты»:

1. совмещение в одной системе координат «продукт-отклик» двух дискретных вариационных рядов специфических «(IgGi)n иммунных откликов», полученных при первичном и вторичном тестировании, позволяет отчетливо проследить динамику реакции организма на тестируемые пищевые антигены, вызывающие аномально высокие реакции иммунной системы до и после периода строгого соблюдения четырехмесячной «элиминационной диеты».

Статистически достоверно наблюдаемое исчезновение ряда «(IgGi)n иммунных откликов» с аномально высокими амплитудами реакций после 4-х месяцев строгой «элиминационной диеты», можно связать со снятием иммунокомплексной стресс-реакции, обусловленной соответствующими пищевыми антигенами. Наоборот, устойчивое сохранение характерных «(IgGi)n иммунных откликов», несмотря на соблюдение «элиминационной диеты», отражает гастроинтестинальные иммунокомплексные реакции воспаления, связанные вероятно с генетическими реализованными проявлениями ферментопатий. Необходимо отметить, что при подобной динамике, использование принципов ротационной диеты [3], не просто бесполезно, но может приводить к негативным эффектам, что часто и наблюдается в клинической практике.

2. Сравнение графических образов «(IgGi)n иммунных ответов», представленных в виде огибающих вариационных рядов «(IgGi)n иммунных откликов» или ФРПВ «(IgGi)n иммунных откликов» позволяет качественно и количественно оценивать изменение суммарного (для всех тестируемых антигенов) уровня концентраций специфических (IgGi) в кровотоке после 4х месячного соблюдения «элиминационной диеты». Это изменение выражается в уменьшении площади под огибающей «(IgGi)n иммунного ответа» после «элиминационной диеты» по сравнению с первичным тестом.

Подобное сравнение является наиболее информативным инструментом исследования эффективности «элиминационной диеты».

3. Сравнение вида графических образов «(IgGi)n иммунных ответов» представляемых в виде ФРПВ «(IgGi)n иммунных откликов», после «элиминационной диеты» по сравнению с первичным тестом, позволяет проследить как уменьшение количества аномальных

дискретных «(IgGi)n иммунных откликов» при повторном тестировании по сравнению с первичным, так и появление сплошной части спектра, расположенной в области малых значений амплитуд иммунных реакций.

Таким образом, оценка в динамике 4-х месячного соблюдения персонифицированной «элиминационной диеты» в сочетании с контрольными исследованиями позволяют сделать следующие основные выводы:

1. динамика изменения вида распределения частот специфических «(IgGi)n иммунных откликов» от диссипированного спектра к сплошному, отражает клинко-иммунологическую эффективность применения персонифицированной «элиминационной диеты» и период реабилитации в результате снижения антигенной нагрузки в иммунной системе со стороны тестируемого набора пищевых антигенов;

2. диссипация спектра частот в ФРПВ специфических «(IgGi)n иммунных откликов» является признаком сохраняющегося иммунокомплексного воспаления, связанного вероятно с генетическими реализованными проявлениями ферментопатий к тестируемому набору пищевых антигенов;

3. полученные статистически достоверные результаты, показывающие «восстановление»

сплошной части спектра в ФРПВ специфических «(IgGi)n иммунных откликов» после клинически успешного периода строгой «элиминационной диеты», позволяют рассматривать характерный графический образ ФРПВ, как достоверный маркер состояния реактивности иммунной системы индивида по IgG признаку;

4. использование в клинической практике данной физической модели обработки и интерпретации результатов ELISA IgG и методологии сравнительного анализа графических образов специфических «(IgGi) n иммунных ответов» может стать объективным критерием оценок иммунореабилитации и клинко-иммунологической эффективности соблюдения персонифицированной «элиминационной диеты» в заболеваниях, обусловленных иммунопатологическими реакциями III типа.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Розенштейн М. Ю., Ихалайнен Е. С., Кондаков С. Э. и др. Вестник МГУ, сер.2. Химия, 2011, т. 52, № 3 с.233-239.
2. Atkinson W., Sheldon T.A, Shaat N., Whorwell P.J. Gut. 2004, Oct.53 (10): 1459-64
3. Skypala I., Venter C. Food Hypersensitivity: Diagnosing and Managing Food Allergies and Intolerance, Wiley-Blackwell, 2009, 371 p.

### DYNAMICS OF SPECIFIC IGG TO FOOD ANTIGENS AS PERSONIFIED MARKER OF THE HUMAN IMMUNE SYSTEM

<sup>1</sup>Rosenstein M. Yu., <sup>1</sup>Rosenstein A. Z, <sup>2</sup> Kondakov S. E,  
<sup>3</sup>Cherevko N.A.

<sup>1</sup>Clinic ImmunoHeath, New York, USA; <sup>2</sup>Moscow State University, Moscow, <sup>3</sup>SSMU, Tomsk, Russia

Statistically significant patterns in the dynamics of specific «(IgGi) n immune response» before and after «elimination diet» have been detected, allowing us to find correlations between the characteristics of the specific «(IgGi) n immune responses» and the clinical and immunological effectiveness of treatment utilizing the «elimination diet». A new approach to the evaluation and justification of immunorehabilitation based on personalized «elimination diet» as a method of antigen-unloading treatment of a number of diseases caused by type III immunological reactions is suggested.

## ПРЕПАРАТ ДЛЯ УСКОРЕННОЙ ДИАГНОСТИКИ ИНФЕКЦИЙ, ВЫЗВАННЫХ ЭНТЕРОБАКТЕРИЯМИ НА ОСНОВЕ ВЫЯВЛЕНИЯ ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО ФЕРМЕНТА У КЛЕБСИЕЛЛ

Саидова П. С., Омарова С. М., Горелова В. Г., Алиева А. И.,  
Исаева Р. И., Алиева С. Ф.

*Дагестанская государственная медицинская академия, Махачкала, Россия*

Разработан препарат для ускоренной диагностики клебсиеллёзной инфекции на основе выявления внутриклеточного видоспецифического фермента потенциально патогенных для человека клебсиелл: 5-аминосалицилат-декарбоксилазы. Состав предлагаемой среды позволяет обеспечить высокую чувствительность препарата и дифференцирующие свойства в сравнении с известными традиционными средами. Выделение и идентификация клебсиелл на предлагаемой среде осуществляется в один этап, что существенно сокращает сроки постановки диагноза.

*Ключевые слова:* инфекции, условно-патогенные энтеробактерии, питательная среда.

В определённых условиях условно-патогенные энтеробактерии (УПЭ) приобретают существенное этиологическое значение, являясь нередко причиной острых кишечных инфекций, бактериурии, бактериемии, инфекций мочевыводящих органов и т.д. Кроме того, УПЭ способны вызывать патологические процессы у людей с нарушениями нормальной резистентности организма, играя роль возбудителей вне- и внутрибольничных инфекционных осложнений у ослабленных и тяжёлобольных, что связано проявлением потенциальных факторов патогенности, и может стать причиной возникновения различных нозологических форм заболеваний, в том числе и у детей раннего возраста [1, 4, 5].

При проведении микробиологических исследований клинического материала различного происхождения бактериологическую службу и клиницистов интересуют скорость получения результата, с выделением и идентификацией культур, что является важным компонентом для начала своевременной этиотропной терапии [4].

В связи с этим разработка современных иммунобиологических препаратов для ускоренной идентификации УПЭ, в частности, клебсиелл, является актуальной задачей для практического здравоохранения. В связи с отсутствием особенностей клинической картины заболеваний,

вызываемых УПЭ, правильный и своевременный диагноз клебсиеллёзной инфекции может быть поставлен только на основании бактериологической диагностики [2, 3, 5]. К питательным средам для выделения клебсиелл относятся дифференциально-диагностические питательные среды, в которых заложен принцип ферментации лактозы или инозита [4, 5]. Однако для определения принадлежности выделенных культур к клебсиеллам необходима постановка целого ряда подтверждающих тестов [2, 3], а, следовательно, это потребует значительного времени (от 3-х до 5-ти суток).

Целью настоящего исследования было получение питательной среды для ускоренной диагностики клебсиеллёзной инфекции на основе выявления внутриклеточного видоспецифического фермента клебсиелл.

В работе использовали отечественные сухие питательные среды и основы (НПО «Питательные среды» г. Махачкала): питательный агар (СПА), панкреатический гидролизат казеина (ПГК), пептон из сои, экстракт кормовых дрожжей (ЭКД), а также парааминобензойная кислота (ПАБК), глюкоза, индикатор бромтимоловый синий, трис-буфер, натрий углекислый, бриллиантовая зелень и 5-аминосалициловая кислота (5-АСК).

Для контроля качества среды использовали музейные культуры, полученные из ФГУП

ГИСК имени А. А. Тарасевича. Физико-химические и биологические свойства препарата определяли в соответствии с МУК (М., 1980; М., 1977) для контроля качества разрабатываемых питательных сред.

В процессе конструирования питательной среды изучали три варианта питательного агара: на панкреатическом гидролизате каппийской кильки (СПА), на соевом пептоне и на панкреатическом гидролизате казеина (ПГК). Все три варианта питательного агара по содержанию аминного азота ( $100 \pm 10$  мг%), хлоридов ( $0,6 \pm 0,1$  мг%) и прочности студня ( $320 \pm 20$  г) были идентичны. Тем не менее, рост тест-штаммов на них через 20–24 ч инкубации при  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$  отличался.

Лучший рост отмечался при посеве штаммов *K. pneumoniae* на образце с СПА, который и был выбран в качестве питательной основы конструируемого препарата. Для выявления фермента 5-аминосалицилатдекарбоксилазы клебсиелл, в состав среды ввели 5-АСК, а для дифференциации клебсиелл – от других УПЭ, не расщепляющих 5-АСК. Селективные свойства среды обеспечили введением в состав бриллиантовой зелени. С целью стимулирования роста тест-штаммов *K. pneumoniae* в среду ввели ПАБК и ЭКД.

Сравнительная характеристика дифференцирующих свойств питательных сред для выделения и идентификации клебсиелл показала, что на средах Эндо и инозит агаре дифференцировать колонии клебсиелл от других

УПЭ не возможно из-за сходства окраски (красные – на среде Эндо и жёлтые – на инозит агаре). На предлагаемой среде только клебсиеллы формировали колонии коричневого цвета с коричневым преципитатом вокруг, что является следствием расщепления 5-АСК 5-аминосалицилатдекарбоксилазой клебсиелл с образованием пара-аминофенола, который под действием кислорода воздуха образует полимер коричневого цвета. Следовательно, в дальнейшей идентификации клебсиелл необходимости не было, в то время как подозрительные на клебсиеллы колонии, выделенные на средах Эндо и инозит-агаре, требовали постановки ряда подтверждающих тестов. Предлагаемая среда позволяет идентифицировать патогенные для человека клебсиеллы одновременно с их выделением, т.е. в один этап.

Таким образом, использование предлагаемой среды позволит ускорить диагностику клебсиеллёзной инфекции и сократит время на исследование.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бондаренко В.М., Баркус М. М., ЖМЭИ, 1986, 7, С. 28-32.
2. Горченина Л. В., Киселёва Б. С., 1985, 1, С. 19-22.
3. Красноголовец В. Н., Киселёва Б. С. Клебсиллёзные инфекции. М., 1996, 253 с.
4. Меджидов М. М. Справочник по микробиологическим питательным средам. М., 2003, С. 63-64.
5. Энтеробактерии. Руководство для врачей. Под ред. В. И. Покровского. М., 1985, 318 с.

### PREPARATION FOR THE RAPID DIAGNOSTICS OF INFECTIONS CAUSED BY ENTEROBACTERIA ON THE BASIS OF THE IDENTIFICATION OF INTRACELLULAR ENZYME FROM KLEBSIELLA

Saidova P. S., Omarova S. M., Gorelova V. G., Alieva A. I.,  
Isayeva R. I., Alieva S. F.

*Dagestan State Medical Academy, Makhachkala, Russia*

For the rapid diagnostics of Klebsiella infection the preparation was developed that identifies the species-specific intracellular enzyme potentially pathogenic for human Klebsiella that is 5-aminosalicylate decarboxylase. The composition of the proposed medium enables high sensitivity and differentiating properties of the preparation in comparison with known conventional fluids. Isolation and identification of Klebsiella in the proposed environment is carried out in one step, which significantly reduces the time of diagnostics.

*Key words:* infections, opportunistic enterobacteria, nutrient medium.

## ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ВГЧ-6-ИНФЕКЦИИ ПРИ РАЗНЫХ КЛИНИЧЕСКИХ ФОРМАХ ОФТАЛЬМОПАТОЛОГИИ

Светлова Е. В.<sup>1</sup>, Слепова О. С.<sup>1</sup>, Денисова Е. В.<sup>1</sup>, Ковалева Л. А.<sup>1</sup>,  
Еремеева Е. А.<sup>1</sup>, Макаров П. В.<sup>1</sup>, Кугушева А. Э.<sup>1</sup>, Вахова Е. С.<sup>1</sup>,  
Андрюшин А. Е.<sup>1</sup>, Демкин В. В.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ФГБУ «МНИИ ГБ им. Гельмгольца» Минздрова России Лаборатория иммунологии и вирусологии; <sup>2</sup>«Институт молекулярной генетики РАН» Лаборатория молекулярной диагностики, Москва, Россия

С целью изучения роли ВГЧ-6 в развитии заболеваний глаз проведено ПЦР-исследование (146) и серологическая диагностика крови на наличие маркеров хронической (IgG-антитела, 110) и активной инфекции (IgM-антитела, 40) ВГЧ-6. Установлено, что ВГЧ-6 типа может выявляться у пациентов с разными клиническими формами заболевания глаз как в хронической, так и в активной форме инфекции, а ДНК вируса обнаруживаться в крови. Полученные данные позволяют предположить, что комплексное лабораторное обследование (серологическая диагностика и ПЦР) на разные, в том числе малоизученные офтальмотропные инфекции (в частности – ВГЧ-6 типа), является неотъемлемым этапом постановки правильного диагноза офтальмологическим больным.

**Ключевые слова:** вирус герпеса человека 6 типа, заболевания глаз, кровь, полимеразная цепная реакция, серологическая диагностика.

**Актуальность и цель работы.** ВГЧ-6 типа является серьезным претендентом на роль этиологического агента ряда неврологических заболеваний, таких как фебрильные судороги, рассеянный склероз и ВГЧ-6-ассоциированные менингиты и энцефалиты [1]. Активное изучение вируса ведется в онкологии, так как известны случаи нозофарингеальных карцином и рака шейки матки, где кофактором выступает ВГЧ-6 [2].

Роль ВГЧ-6 в возникновении глазной патологии только начинает изучаться. Одним из важных вопросов является адекватная оценка результатов общепринятых диагностических методов – ПЦР (определение ДНК возбудителя) и ИФА (выявление антител – маркеров хронической и активной инфекции) применительно к заболеваниям глаз.

**Цель работы** – серодиагностика и ПЦР-исследование крови на ВГЧ-6 при разных клинических формах офтальмопатологии.

**Материалы и методы.** Всего обследовано 159 человек (86 мужчин и 73 женщины, в возрасте от 4 до 82 лет). Распределение по клини-

ческим формам: язвы роговицы – 59 чел, в т.ч. центральные – 45; бельмо роговицы – 25 чел.; болезнь кератотрансплантата – 13 чел.; увеиты – 55 чел., в т.ч. кератоувеиты – 3, передние – 43, периферические – 9; травмы глаза – 7 чел. Материалом исследования служила кровь (n=159).

ПЦР в реальном времени проводили 146 пациентам (система СFX96ТМ в комплексе с термоциклером С1000). Для выделения ДНК из биоматериала использовали тест-систему РеалБест ДНК-экстракция (кровь). Для определения ДНК вируса использовалась тест-система РеалБест ДНК ВГЧ-6 («ВекторБест», Россия). Часть материала исследовалась на базе лаборатории молекулярной диагностики «Института молекулярной генетики РАН» (зав. лаб. – к. м. н. В. В. Демкин). ДНК выделяли с использованием набора ДНК-сорб-В (AmpliSens, ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, РФ) согласно инструкции производителя.

Серологическая диагностика с помощью иммуноферментного анализа (ИФА) была проведена 110 пациентам в сыворотке крови

(СК): определялись маркеры хронической инфекции – IgG-антитела (тест-системы «Вектор Бест», Россия). Маркеры активной инфекции (IgM-антитела) определялись в СК у 40 пациентов (тест-системы «Vidia», Чехия).

Параллельное одновременное исследование крови на наличие серологических маркеров (IgG-антитела, IgM-антитела) и ДНК вируса было проведено 40 пациентам. Статистическая обработка полученных данных проведена по системе «BIOSTATD-1998» (описательная статистика, критерии  $\chi^2$ , Фишера и Стьюдента).

**Результаты.** Серологическое исследование показало, что маркеры хронической инфекции (IgG-антитела) были обнаружены у 68,5% обследованных (74 из 108), IgM-антитела выявились у трети пациентов (32,5%; 13 из 40). ДНК вируса была обнаружена только у 20,5% больных (30 из 146).

Результаты комплексного исследования (серодиагностика и ПЦР) крови показали, что положительными хотя бы на один тест оказались 90% (36 из 40) обследованных; свободными от инфекции – только 10% пациентов (4 из 40). Наиболее часто выявлялись IgG-антитела – маркеры хронической инфицированности (29 из 40 случаев, 72,5%); ДНК ВГЧ-6 в крови была обнаружена у 18 из 40 больных (45%); маркеры активной инфекции (IgM-антитела) – у трети обследованных (13 из 40; 32,5%). Положительными по всем трем тестам (IgG, IgM-антитела и ДНК) оказались только 5 из 40 пациентов (12,5%).

Дифференцированный анализ результатов исследования крови показал, что половина обследованных пациентов (20 из 40; 50%) имели в крови серологические маркеры хронической инфекции (IgG-антитела), при этом часть из них (8 из 40, 20%), на фоне вирусемии (ДНК). Маркеры активации хронической инфекции (IgG, IgM-антитела) были обнаружены у 9 из 40 обследованных (22,5%). Признаки первичного инфицирования (только IgM-антитела) встречались вдвое реже – в 4 из 40 случаев (10%). Следует отметить, что маркеры первичной активной инфекции (IgM-антитела) выявлялись с одинаковой частотой независимо от наличия или отсутствия ДНК в крови.

В результате исследования выяснилось, что маркеры инфицированности ВГЧ-6 в разных сочетаниях встречались во всех нозологических группах. Пациенты с патологией сосудистой оболочки глаза (увеитами различного генеза) в 7 из 12 случаев (58,3%) имели в крови маркеры хронической инфекции (IgG-антитела). Обращает внимание то, что больные с ревматоидными увеитами на фоне вирусемии (ДНК в крови была обнаружена у всех 7 пациентов) в 57,1% случаев (4 из 7) имели в крови серологические маркеры активации хронической инфекции (IgG, IgM-антитела). Высокий процент инфицированности в данной нозологической группе, скорее всего, связан с терапией препаратами иммуносупрессивного действия (метипред, метотрексат и др.), которые, вероятно, привели к снижению иммунитета с последующим инфицированием ВГЧ-6.

Более половины (8 из 15, 53,3%) пациентов с язвами роговицы различной этиологии (в том числе послеоперационными) имели маркеры хронической инфекции – IgG-антитела. Серологические маркеры первичной активной инфекции (IgM-антитела) были обнаружены у 26,7% (4 из 15) обследованных с язвами, при этом зависимости от наличия ДНК вируса в крови выявлено не было.

Половина (3 из 6, 50%) больных с поствоспалительными бельмами роговицы имели в крови маркеры активации хронической инфекции (IgG и IgM-антитела), что позволяет думать о негативной роли ВГЧ-6 типа в возникновении и течении данной патологии.

У трех пациентов в различных клинических группах (язвы неизвестной и бактериальной этиологии, бытовые травмы глаза) была выявлена ДНК вируса в крови на фоне отсутствия серологических маркеров (IgG, IgM-антитела). Отсутствие иммунного ответа может быть обусловлено иммуносупрессивным действием лекарственных препаратов, иммунодефицитами различного генеза или другими факторами.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Barone S. R., Kaplan M. H., Krilov L. R. J Pediatr 1995, 127, 95-97.
2. Amirian E. S., Adler-Storthz K., Scheurer M. E. Cancer Letters 2013, 336 (1), 18-23.

## LABORATORY DIAGNOSTICS OF THE HUMAN HERPES VIRUS TYPE 6 IN DIFFERENT CLINICAL FORMS OF OPHTHALMOPATHOLOGY

Svetlova E.<sup>1</sup>, Slepova O.<sup>1</sup>, Denisova E.<sup>1</sup>, Kovaleva L.<sup>1</sup>, Eremeeva E.<sup>1</sup>,  
Makarov P.<sup>1</sup>, Kugusheva A.<sup>1</sup>, Vahova E.<sup>1</sup>, Andryushin A.<sup>1</sup>, Demkin V.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Moscow Helmholtz Research Institute of Eye Diseases, Laboratory of immunology and virology;

<sup>2</sup>Institute of Molecular Genetics RAS, Laboratory of molecular diagnostics, Moscow, Russia

To study the role of HHV-6 in the development of eye diseases PCR tests (146) and serodiagnosis of blood for the markers of chronic (IgG antibodies, 110) and active (IgM antibodies, 40) HHV-6 infection were conducted. It was established that HHV-6 can be detected in patients with different clinical forms of ophthalmopathy both in chronic and active forms and the viral DNA can be found in blood. The obtained data suggest that complex laboratory testing (serodiagnosis and PCR) for various infections, including understudied ophthalmic infections (HHV-6, in particular) is an essential step in the correct diagnosis of ophthalmologic patients.

---

## НОВЫЙ МЕТОД РАЗДЕЛЕНИЯ ПОПУЛЯЦИЙ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ ГЕМОЦИТОВ ЛЕГОЧНЫХ МОЛЛЮСКОВ С ПОМОЩЬЮ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ

Серебрякова М. К.<sup>1,2</sup>, Прохорова Е. Е.<sup>2</sup>, Токмакова А. С.<sup>2</sup>,  
Кудрявцев И. В.<sup>1,3</sup>, Полевщиков А. В.<sup>1,3</sup>, Атаев Г. Л.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ФГБУН «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург; <sup>2</sup>Российский государственный педагогический университет им. А. И. Герцена, Санкт-Петербург;

<sup>3</sup>Школа биомедицины Дальневосточного федерального университета,  
Владивосток, Россия

В работе предлагается новый подход к определению популяций циркулирующих гемоцитов легочных моллюсков с помощью проточной цитофлуориметрии, позволяющий не только выделить классические популяции гранулоцитов и гиалиноцитов, основываясь на их морфологии, но и разделить их на отдельные субпопуляции, различающиеся, по всей видимости, по метаболической активности и содержанию лизосом.

*Ключевые слова:* гемоциты, проточная цитометрия, легочные моллюски, популяционный состав, *Planorbarius corneus*.

**Актуальность и цель работы.** Легочные моллюски являются объектом интереса исследователей в разных областях биологии – зоология, паразитология и сравнительная иммунология. Во многом это обусловлено участием этих животных в жизненном цикле трематод, которые используют их в качестве промежуточного хозяина. Кроме того, моллюски используются в качестве модели в сравнительно-иммунологических исследованиях. Как

известно, защитные реакции моллюсков на различные патогены обеспечиваются клеточными и гуморальными составляющими гемолимфы. Циркулирующие клетки гемолимфы моллюсков традиционно разделяют на два основных типа – гиалиновые клетки и гранулоциты. Подробный морфологический анализ позволяет выделить в каждой из этих популяций несколько разных морфотипов, предположительно характеризующих разные стадии



созревания и степень метаболической активности в клетках [1]. Анализ соотношения разных типов гемоцитов моллюсков в норме и при заражении является важным шагом к пониманию иммунных реакций этих животных. Наиболее удобным методом для проведения таких экспериментов, обеспечивающим высокую производительность и статистическую достоверность, является проточная цитометрия. Однако на сегодняшний день этот метод мало используется в исследовании иммунных реакций беспозвоночных, как в силу отсутствия специфических реагентов, так и из-за недостатка простых и удобных подходов к типированию их клеток. Целью данной работы было разработать новый метод анализа популяционного состава гемоцитов легочных моллюсков, основанный на оценке содержания в них нуклеиновых кислот и лизосом.

**Материалы и методы.** В работе использовали флуоресцентные красители SYTO62 Red Fluorescent Nucleic Acid Stain (далее SYTO62) и LysoTracker® Green DND-26 (далее LysoTracker) (Life Technologies, США). Отличительной чертой красителей семейства SYTO® является способность спонтанно проникать через клеточные мембраны и связываться с нуклеиновыми кислотами в клетке. Такого рода взаимодействие сопровождается многократным увеличением флуоресценции, тогда как в отсутствие связывания с лигандами флуоресценция данных красителей крайне низка [2]. Красители LysoTracker® являются ацидофильными флуоресцентными красителями, способными диффундировать через плазмалемму и накапливаться в лизосомах, что дает возможность разделять общий пул циркулирующих клеток на отдельные популяции по содержанию лизосом [3]. При исследовании гемоцитов моллюсков, способность к фагоцитозу различных популяций которых существенно различается, этот параметр оказывается особенно значимым.

В работе использовали моллюсков *Planorbarius corneus* (*Gastropoda*, *Pulmonata*, *Planorbidae*). Гемолимфу собирали из кровеносного синуса в головном отделе моллюсков с помощью пипетки Пастера, изготовленной из нейтрального стекла. Свежевыделенную гемолимфу смешивали в соотношении 1:1 с раствором Чернина, после чего добавляли красители SYTO62 и LysoTracker, получая финальную концентрацию красителей 1 мкМ. Образцы

инкубировали 10 мин в темноте на льду, и, по завершении инкубации, сразу анализировали на проточном цитометре BD Accuri™ C6 (BD Biosciences, США). Для каждой из клеток оценивали следующие параметры: прямое светорассеяние, пропорциональное размеру клетки, боковое светорассеяние, характеризующее структуру клетки, и интенсивность флуоресценции красителей LysoTracker и SYTO62. Обработку результатов проводили в программном обеспечении Kaluza™ v.1.3 (Beckman Coulter, США).

**Результаты и обсуждение.** По параметрам прямого и бокового светорассеяния в гемолимфе *P. corneus* можно выделить три популяции циркулирующих гемоцитов, различающихся по структуре и размеру. В состав первой популяции входят клетки наименьшего из всех размера, с простой организацией цитоплазматического компартмента, что соответствует морфологическим характеристикам гиалиноцитов. Вторая популяция клеток обладает более высокими параметрами прямого и бокового светорассеяния, что свидетельствует о более сложной структуре и крупных размерах. Клетки, составляющие эту популяцию, могут рассматриваться как гранулоциты. Клетки наибольшего размера с наиболее сложной структурой могут быть отнесены к отдельной фракции. По уровню флуоресценции красителей SYTO62 и LysoTracker в общем пуле циркулирующих гемоцитов выделяются пять популяций клеток. Первая характеризуется средним уровнем накопления клетками лизосомального красителя и низкой способностью накапливать SYTO62. Вторую популяцию отличает от популяции 1 более высокий уровень содержания в клетках SYTO62, в то время как интенсивность флуоресценции LysoTracker остается на том же уровне. Третья популяция характеризуется повышением флуоресценции обоих красителей. Максимальный уровень флуоресценции SYTO62 наблюдается в двух популяциях, различающихся по способности накапливать LysoTracker – в четвертой популяции уровень флуоресценции данного красителя максимальный, а пятой – минимальный среди всех клеток.

Способность витальных красителей семейства SYTO® связываться с нуклеиновыми кислотами очень удобна для использования в проточной цитометрии, в первую очередь, при отделении клеток от дебриса. Кроме того,

изменение уровня флуоресценции данных красителей может свидетельствовать об изменении количества РНК в клетках, что является отражением протекающих в клетке метаболических процессов. Именно это свойство определяет возможность их использования для разделения популяций циркулирующих гемоцитов беспозвоночных, как, например, в работе Гринченко и др. [4]. В свою очередь красители семейства LysoTracker® позволяют отделять фагоцитирующие клетки от клеток другой специализации [5]. Совместное использование вышеописанных красителей дает возможность выделить среди общего числа гемоцитов не только характерные популяции гиалиноцитов и гранулоцитов, но и разделить их на отдельные субпопуляции, основываясь

на их функциональных и метаболических особенностях.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Атаев Г.Л., Полевщиков А.В. Паразитология 2004, 38 (4), 342-351.
2. Wlodkowic D., Skommer J., Pelkonen J. Cytometry A 2007, 71 (2), 61-72.
3. Кудрявцев И.В., Хайдуков С.В., Зурочка А.В., Черешнев В.А. Проточная цитометрия в экспериментальной биологии. Екатеринбург: РИО УрО РАН, 2012, 192 с.
4. Гринченко А.В., Кудрявцев И.В., Кумейко В.В., Шилов А.С., Полевщиков А.В. Российский иммунологический журнал 2014, 8 (17), С. 993-1001.
5. Donaghy L., Hong H.-K., Lambert Ch., Park H.-S., Shim W.J. Choi K.-S. Fish Shellfish Immunol 2010, 28, 87-97.

#### NEW METHOD FOR DETERMINATION OF PULMONATA HEMOCYTES BY FLOW CYTOMETRY

Serebriakova M. K.<sup>1,2</sup>, Prokhorova E. E.<sup>2</sup>, Tokmakova A. S.<sup>2</sup>, Kudryavtsev I. V.<sup>1,3</sup>, Polevshchikov A. V.<sup>1,3</sup>, Ataev G. L.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Federal State Budgetary Scientific Institution "Institute of Experimental Medicine", St.-Petersburg;  
<sup>2</sup>Herzen State Pedagogical University of Russia, St.-Petersburg; <sup>3</sup>School of Biomedicine of Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russia

New method for determination of pulmonata hemocytes subpopulations with the help of flow cytometry is proposed. This method allows dividing the fraction of circulating hemocytes into the separate populations not only by morphological features but also by the difference in metabolic processes and lysosomal content.

#### ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ ПРОГНОЗА РАЗВИТИЯ ПСОРИАТИЧЕСКОГО АРТРИТА

Смольников М. В., Смирнова С. В., Барило А. А.

Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера,  
Красноярск, Россия

Особое внимание к проблеме псориаза (ПС) в настоящее время обусловлено увеличением числа тяжелых, атипичных, инвалидизирующих форм заболевания, таких как псориазический артрит (ПсА). Приведены результаты исследования особенностей клеточного и гуморального звена иммунитета у 97 больных псориазом. Определены маркеры формирования ПС и ПсА.

*Ключевые слова:* псориаз, псориазический артрит, иммунопатогенез, иммунологические показатели

**Актуальность.** Особое внимание к проблеме ПС в настоящее время обусловлено его частой манифестацией в молодом трудоспо-

собном возрасте, увеличением числа тяжелых, атипичных, инвалидизирующих форм заболевания, таких как псориазический ар-

трит (ПсА) [1]. При отсутствии адекватного лечения у больных ПсА наблюдается прогрессирующее поражение суставов и серьезные ограничения физической активности, ведущие к инвалидизации [2]. Доказано, что основу иммунологических нарушений при ПС и ПсА составляет активация клеточного иммунного ответа с ведущей ролью Т-лимфоцитов [4,5]. В патогенезе ПС и ПсА иммунологическим нарушениям отводится приоритетная роль, причем данные патологии рассматриваются как Th17/Th1-зависимые аутоиммунные заболевания [3]. Изучение иммунологических особенностей развития ПсА позволит установить новые маркеры прогрессирования патологии и ориентировать клиницистов в направлении патогенетически обоснованной коррекции выявленных нарушений, что поможет предотвратить формирование тяжелых форм ПС и благоприятно повлиять на прогноз заболевания.

**Цель работы.** На основании изучения основных показателей клеточного и гуморального звена иммунитета установить иммунологические маркеры, имеющие прогностическое значение в отношении формирования ПсА.

**Материалы и методы.** Обследовано 97 больных ПС в возрасте от 18 до 66 лет, которые с учетом клинических проявлений были разделены на 3 группы: 1 группа – больные ПС (n=49), 2 группа – больные ПсА (n=48), 3 группа – практически здоровые доноры крови (n=45), сопоставимые по полу и возрасту. Все больные обследованы в прогрессирующую стадию кожного процесса до начала проведения симптоматической и патогенетической терапии. Степень тяжести псориатического процесса, выражаемая международным индексом PASI (Psoriasis Area and Severity Index – индекс оценки степени тяжести ПС) оценивалась с использованием стандартизированной бальной системы оценки основных клинических симптомов. Значения PASI до 9,9 балла включительно рассматривали как легкую степень тяжести ПС, 10,0–15,9 баллов – как среднюю степень тяжести, 16 баллов и более – как тяжелую степень псориатического процесса. Популяционный и субпопуляционный состав лимфоцитов крови оценивали с помощью непрямой иммунофлуоресценции с использованием моноклональных антител к CD3, CD4, CD8, CD16, CD19. Концентрация IgA, IgM, IgG, ЦИК (C3d и C1q) в сыворотке крови определялась с помощью твердофазного им-

муноферментного анализа. Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием прикладных программ «Statistica 6.0». Полученные результаты представлены в виде: Me (25%; 75%). Для всех видов статистического анализа различия считались статистически достоверным при достигнутом уровне значимости  $p < 0,05$ .

**Результаты.** В 1 группе у 10 (20,4%) больных отмечена легкая степень тяжести, у 21 (42,9%) – средняя, у 18 (36,7%) – тяжелая степень заболевания. Во 2 группе 7 (14,5%) больных ПС имели легкую, 7 (14,5%) – среднюю, 34 (71,0%) – тяжелую степень течения кожного процесса.

При исследовании иммунологических показателей в обеих группах больных ПС выявлен выраженный дисбаланс клеточного звена иммунитета. При анализе экспрессии кластеров дифференцировки Т-лимфоцитов в обеих группах больных ПС выявлены статистически значимые увеличения содержания субпопуляций CD3<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup>-лимфоцитов в сравнении с контрольной группой.

При изучении особенностей показателей клеточного звена иммунитета при ПС и ПсА в зависимости от степени тяжести клинического течения заболевания было установлено, что в группе больных с тяжелой степенью течения ПсА отмечается достоверное снижение содержания CD3<sup>+</sup>-лимфоцитов в сравнении с группой больных с тяжелой степенью ПС: 75,0% (74,0; 80,0) и 81,0% (77,0; 86,0), соответственно,  $p_{1,2}=0,01$ . Возможной причиной снижения в крови CD3<sup>+</sup>-лимфоцитов по мере увеличения тяжести ПсА является их мобилизация в очаг воспаления либо истощение механизмов иммунной защиты. При сравнении больных ПС и ПсА легкой и средней степени тяжести заболевания достоверных различий в количестве CD3<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, CD16<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup>-клеток не выявлено.

При изучении особенностей гуморального звена иммунитета в обеих группах больных ПС независимо от степени тяжести заболевания выявлено статистически значимое снижение уровня IgA, IgM, IgG в сравнении с контрольной группой. У больных со средней степенью тяжести ПС выявлен более высокий уровень IgG в сравнении с группой больных ПС с легкой степенью тяжести заболевания: 10,7 г/л (9,1; 12,6) и 7,1 г/л (6,9; 8,1), соответственно,  $p_{1,2}=0,002$ .

При изучении уровня ЦИК в обеих группах больных ПС выявлены более высокие уровни ЦИК-С1q в сравнении с контрольной группой: 1,8 мг IgG/мл (1,6; 2,3), 2,0 мг/мл (1,5; 2,7), 1,6 мг IgG/мл (1,3; 2,0), соответственно,  $p_{1,2}=0,07$ ,  $p_{1,3}=0,04$ ,  $p_{2,3}=0,02$ . Кроме того, в группе больных ПсА отмечается статистически значимое увеличение концентрации ЦИК-С3d в сравнении с контрольной группой: 23,2 мг IgG/мл (17,0; 36,2) и 18,8 мг IgG/мл (14,0; 23,5), соответственно,  $p_{1,3}=0,04$ . Следовательно, при ПсА происходит гиперактивация классического и альтернативного путей комплемента, что подтверждает роль аутоиммунных процессов в развитии суставного синдрома. В зависимости от тяжести клинического течения заболевания в группах больных ПС и ПсА было установлено, что активация альтернативного пути комплемента свидетельствует о формировании тяжелого течения ПС с генерализацией процесса либо прогрессировании ПС в ПсА. Так, при ПС легкой степени тяжести уровень ЦИК-С3d в сыворотке крови достоверно ниже, чем при ПсА легкой, средней и тяжелой степени тяжести заболевания: 15,6 мг IgG/мл (12,3; 18,6) против 35,3 мг IgG/мл (26,4; 46,5), 34,5 мг IgG/мл (21,3; 43,8) и 21,3 мг IgG/мл (13,0; 29,2), соответственно,  $p_{1,2}=0,05$ ;  $0,02$ ;  $0,01$ . Уровень ЦИК-С3d при ПсА обратно пропорционален степени тяжести заболевания, что может быть обусловлено отложением иммунных комплексов в органах-мишенях в результате прогрессирования заболевания. В группе больных ПС выявлены статистически значимые повышения ЦИК-С3d при тяжелом течении заболевания в сравнении с группой больных с легким течением ПС: 23,2 мг/мл (16,4; 31,4) и 15,6 мг/мл (12,3; 18,6), соответственно,  $p_{1,2}=0,01$ . В группе боль-

ных ПсА не выявлено достоверных различий в концентрации CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, CD16<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup>-клеток и уровне IgA, IgM, IgG в зависимости от степени тяжести кожного процесса.

Гиперактивный гуморальный иммунный ответ с активацией классического и альтернативного путей комплемента свидетельствует о развитии патологического «иммунокомплексного» синдрома, который способствует формированию системной воспалительной реакции, которая проявляется генерализацией процесса, увеличением степени тяжести заболевания либо вовлечением в патологический процесс суставов. Таким образом, наши исследования показали, что при ПС и ПсА наблюдаются изменения как клеточного, так и гуморального звена иммунитета. Выявлены маркеры ПС: увеличение содержания субпопуляций CD3<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>-лимфоцитов и уровня CD16<sup>+</sup>-клеток, а также снижение концентрации IgA, IgM, IgG, активация классического пути комплемента. Маркерами формирования ПсА можно считать: снижение содержания CD3<sup>+</sup>-лимфоцитов, активация альтернативного пути комплемента.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Смирнова С. В., Смольникова М. В., Райкова В. Ю. // Цитокины и воспаление. – 2010. – Т. 9, № 4. – С. 121-122.
2. Chandra, V., Raychaudhuri S. P. // J. Autoimmun. – 2010. – Vol. 34. – P. 314-321.
3. Goldenstein-Schainberg C., Favarato M. H., Ranza R. // Rev. Bras. Reumatol. – 2012. – Vol. 52, № 1. – P. 98-106.
4. Sankowski A. et al. // Pol. J. Radiol. – 2013. – Vol. 78, № 1. – P. 7-17.
5. Kim J., Krueger J. G. // Dermatol. Clin. – 2015. – Vol. 33, № 1. – P.13-23.

### IMMUNOLOGICAL MARKERS OF PROGNOSIS IN PSORIATIC ARTHRITIS DEVELOPMENT

Smolnikova M. V., Smirnova S. V., Barilo A. A.

*Scientific Research Institute of Medical Problems of the North,  
Krasnoyarsk, Russia*

Special attention to the problem of psoriasis (PS) at the present time is determined by increasing incidence of higher frequency of severe and disabling clinical forms, e.g., psoriatic arthritis (PsA). The review presents data on the particularities of cellular and humoral immunity examination in 97 psoriatic patients. In addition, there were determined markers for PS and PsA.

*Keywords:* psoriasis, psoriatic arthritis, immune pathogenesis, immunological indicators.

## ИММУНОДИАГНОСТИКА ЗАБОЛЕВАНИЙ, ВЫЗВАННЫХ *YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS* И *YERSINIA ENTEROCOLITICA*

Тимченко Н. Ф.<sup>1</sup>, Раев М. Б.<sup>2</sup>, Бынина М. П.<sup>1</sup>,  
Псарева Е. К.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБУН «НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Г. П. Сомова», Владивосток;

<sup>2</sup>Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь, Россия

В работе приведены данные по иммунодиагностике инфекционных болезней, вызванных патогенными видами *Yersinia* (*Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica*) в РФ. Показано, что с помощью типовых, а также разработанных новых видовых и родовых тест-систем, можно эффективно диагностировать заболевания, вызванные этими микроорганизмами.

**Ключевые слова:** *Yersinia pseudotuberculosis*, *Yersinia enterocolitica*, инфекция, иммунодиагностика.

Сообщения о появлении новых болезней стали уже обычными для медицинской общест­венности, в частности, для микробиологов и инфекционистов. Ярким примером этого является чума и псевдотуберкулез. Род *Yersinia* входит в семейство *Enterobacteriaceae*. Он включает в себя 17 видов бактерий, среди которых медицинское значение имеют три вида: *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica*. Известно, что *Y. pestis* – возбудитель чумы, одной из наиболее грозных и опустошительных болезней в истории человека, эволюционировал из *Y. pseudotuberculosis* и является клоном *Y. pseudotuberculosis*. Оба вида генетически почти идентичны. Переход *Y. pseudotuberculosis* в *Y. pestis* сопровождался утратой этим микробом многих и приобретением нескольких генов.

Актуальность проблемы иерсиниозов обусловлена тем, что ежегодно за рубежом и в Российской Федерации регистрируются вспышки и спорадические случаи заболеваний, вызванные *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica*. Первостепенное значение для своевременного выявления этих заболеваний и их лечения имеет лабораторная диагностика. К настоящему времени в РФ разработан алгоритм диагностики иерсиниозов, включающий бактериологический, иммунологические и молекулярно-генетические методы. В сообщении мы обсудим вопросы, касающиеся иммунологической диагностики иерсиниозов.

В РФ для серологической диагностики псевдотуберкулеза и иерсиниоза уже около 50 лет в основном используются типовые системы для реакции агглютинации (РА) и реакции непрямой гемагглютинации (РНГА) [4]. Анализ результатов, полученных с помощью этих тест-систем для серологической диагностики псевдотуберкулеза (01 серотип) и иерсиниоза (03 и 09 серотипы) показал их типоспецифичность и чувствительность. Однако псевдотуберкулез и иерсиниоз могут вызывать также возбудители иных серотипов. В связи с этим у многих больных с типичной клинической картиной антитела не выявляются и, соответственно, они не получают необходимого лечения. Кроме того, имеются проблемы, связанные, в частности, с нестабильностью эритроцитарного антигена, невысокой специфичностью, накоплением перекрестно реагирующих антител и поздние сроки подтверждения диагноза.

В связи с этим, нами была поставлена цель разработать с использованием новых технологий родовые, видовые и типовые диагностические системы для выявления антител к *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica* с более высокими показателями чувствительности, наглядности, надежности, простоты и оперативности. К настоящему времени в РФ такие диагностические системы для иммунологической диагностики псевдотуберкулеза и иерсиниоза созданы, они испытаны в лабораторных и клинических условиях, показана

их высокая чувствительность и специфичность [1, 2, 3, 5].

С помощью *родового* иерсиниозного эритроцитарного диагностикума в РНГА исследованы 224 сыворотки крови больных, заболевание у которых было подтверждено выделением из кала *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica* разных серотипов. [5]. Антитела обнаружены у 100% больных.

Видовые системы для ИФА и РНГА сконструированы на основе белков наружной мембраны и белка Мм 45кД *Y. pseudotuberculosis* [1, 2]. С помощью видо-специфического эритроцитарного псевдотуберкулезного диагностикума в РНГА исследованы 237 сывороток от 158 больных, диагноз "псевдотуберкулез" у которых был подтвержден выделением культур *Y. pseudotuberculosis* 01, 03, 04 серотипов. Процент положительных реакций у больных псевдотуберкулезом, у которых был выделен возбудитель 01 серотипа, составил 83,5%, 03 серотипа – 84,9%, 04 серотипа – 93,5%. Титр реакций был 1:160–1:200 и выше.

Как показали результаты, РНГА с использованием этого диагностикума, сенситивном в котором является белок Мм 45кДа *Y. pseudotuberculosis*, специфична, чувствительна и позволяет обнаружить антитела у больных псевдотуберкулезом уже на первой неделе болезни. С помощью видо-специфического диагностикума в сыворотке крови можно обнаружить антитела не только к 01, но и к 03 и 04 сероварам возбудителя, что позволяет повысить качество диагностики псевдотуберкулеза.

Для выявления антител в сыворотке крови больных псевдотуберкулезом при конструировании видовой тест-системы для ИФА в качестве антигена использован один из токсинов *Y. pseudotuberculosis* – белок мм 45кД. Как установлено, процент подтверждения диагноза болезни с помощью ИФА был высоким и составил 78,5–85,4%.

Другая видовая тест-система для ИФА была создана на основе белка-порина, изолированного из внешней мембраны *Y. pseudotuberculosis*, который также является видо-специфическим антигеном. Иммуноферментный анализ на основе порина позволил выявить антитела в сыворотке крови больных псевдотуберкулезом (исследовано 117 сывороток) в высоком проценте случаев к 01, 03 и 04 серотипам возбудителя [2].

В последние годы на основе конъюгированных наночастиц углерода сконструиро-

вана видовая неферментная система в формате иммуно-мембранных технологий для определения антител к возбудителю псевдотуберкулеза. Тест-система не зависит от аппаратного регистрирующего оборудования и обладает привлекательными процедурно-аналитическими характеристиками: высокой чувствительностью, специфичностью, позволяет сократить время на проведение исследования, а также проста в использовании, наглядна для оценки результатов [3].

Установлено, что безинструментальный способ диагностики псевдотуберкулеза путем прямой визуализации образующегося в ходе специфического взаимодействия иммунного комплекса, состоящего из используемого в качестве антигена белка *Y. pseudotuberculosis* и соответствующих антител, позволяет определять не только антитела к возбудителю псевдотуберкулеза 01 сероварианта, но и других серовариантов (02–08). Это значительно расширяет диагностический диапазон предлагаемого способа диагностики. Визуализация специфического комплекса осуществляется конъюгатом G-белок-углерод в течение 15 минут.

Таким образом, для улучшения качества иммунодиагностики иерсиниозов, болезней, вызванных *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica*, важно включение в алгоритм исследования родовых, видовых и типовых тест-систем. Это позволит более качественно проводить диагностику заболеваний, вызванных патогенными видами *Yersinia*, что будет способствовать своевременному лечению, а также проведению противоэпидемических и профилактических мероприятий. В РФ постоянно ведутся исследования по поиску и разработке новых технологий для иммунологической диагностики инфекционных болезней, в том числе иерсиниозов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Беседнов А. Л., Недашковская Е. П., Тимченко Н. Ф. // Журн. эпидемиол., микробиол. и иммунобиол., 1997. № 4. С. 52.
2. Новикова О. Д., Портнягина О. Ю., Фролова Г. М. и др. // Бюлл. экспер. биол. и мед., 1995. № 8. С. 199–202.
3. Раев М. Б., Тимченко Н. Ф., Бочкова М. С. и др. // Докл. Академии наук., 2013. Т. 451. № 6. С. 695–698.
4. Сомов Г. П., Покровский В. И., Беседнова Н. Н., Антоненко Ф. Ф. // М. Медицина, 2001. 254 с.
5. Тимченко Н. Ф., Павлова Т. Н., Андрюков Б. Г. и др. // Клин. лаб. диагн., 1998. № 7. С. 24–34.

## THE IMMUNOLOGICAL DISEASES CAUSED BY *YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS* AND *YERSINIA ENTEROCOLITICA*

Timchenko N. F.<sup>1</sup>, Rayev M. B.<sup>2</sup>, Bynina M. P.<sup>1</sup>, Psareva E. K.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Federal State Scientific Institution "Research Institute of Epidemiology and Microbiology named GP Somov", Vladivostok; <sup>2</sup>Federal State Scientific Institution «Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms» The Russian Academy of Sciences, Perm, Russia

The paper presents data on immune infectious diseases caused by pathogenic species of *Yersinia* (*Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica*) in the Russian Federation. It is shown that using the official model and developed new species and genera of test systems can effectively diagnose diseases caused by these microorganisms.

*Keywords:* *Yersinia pseudotuberculosis*, *Yersinia enterocolitica*, infection, immunodiagnostics

---

---

## НОВЫЙ ПОДХОД К ИСПОЛЬЗОВАНИЮ КОРРЕЛЯЦИОННОГО АНАЛИЗА ПРИ ИЗУЧЕНИИ ДИНАМИКИ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ

Феофанова Т. В.<sup>1</sup>, Серова Т. А.<sup>2</sup>, Бишева И. В.<sup>2</sup>,  
Фошина Е. П.<sup>2</sup>, Сходова С. А.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России; <sup>2</sup>ФГБНУ НИИВС  
им. И. И. Мечникова, Москва, Россия

Предложено преобразование данных динамического наблюдения за группой объектов с последующим использованием его результатов при расчете парных корреляций. Новый подход апробирован на данных иммунологического исследования «до – после», в котором изучали изменения показателей иммунитета в группе больных в ходе вакцинотерапии. Показано, что данный подход позволяет получить дополнительную информацию об изменениях в иммунной сети.

*Ключевые слова:* Иммунологические показатели, исследование «до – после», корреляции.

Одним из методов выявления изменений в группе объектов в ходе динамического наблюдения «до – после» является корреляционный анализ. Традиционный порядок вычислений состоит в расчете корреляционных связей (КС) между показателями в моменты времени «до» и «после» с последующим их сравнением. Таким способом, например, изучали изменения в иммунной сети группы больных на разных стадиях хронического заболевания (пневмонии) [1]. Наблюдали изменения структуры КС между уровнями бактериальных антител в разных видах биоматериалов (сыворотке крови, слюне, назальном секрете) детей после вакцинотерапии [2]. Как правило, число выявленных статистически значимых КС невелико по срав-

нению с теми, которые оказываются статистически незначимыми. Среди последних особый интерес представляют случаи одновременного отсутствия значимых корреляционных связей в обоих обследованиях – и «до» и «после».

Цель исследования – изучить возможность применения корреляционного анализа для получения дополнительной информации о взаимосвязи изменений параметров иммунитета в ходе их динамической оценки. Задачи исследования: 1) предложить преобразование исходных данных, отражающее изменения параметров иммунитета в исследовании «до-после» в виде динамической характеристики (D); 2) провести корреляционный анализ преобразованных данных.

**Материалы и методы.** У больных (11 чел. 18-50 лет) с хроническими бактериальными инфекциями, проходивших назально-оральное лечение бактериальной вакциной ВП-4, дважды (до и через 0,5-1,5 месяца после последнего приема препарата) оценивали параметры системного иммунитета: значения лейкоцитов, лимфоцитов (Лф), CD-субпопуляций лимфоцитов, иммунорегуляторный индекс (ИРИ) и уровень общих иммуноглобулинов G, A, M – всего 23 показателя, а также уровень специфических антител к антигенам *S. aureus* (AtS.a.) и *Kl. pneumoniae* (AtKl.pn.) G, A и M изотипов в сыворотке крови, слюне и назальном секрете (14 показателей). Динамическую характеристику D для каждого показателя иммунного статуса (ПИС) рассчитывали по формуле:  $D = \text{ПИС}_2 - \text{ПИС}_1$ , где  $\text{ПИС}_1$  – значение показателя в первом обследовании «до»,  $\text{ПИС}_2$  – во втором – «после». Величину коэффициента корреляции (R) определяли методом Спирмена с  $p \leq 0,05$ .

**Результаты.** В качестве основных результатов приведем статистически значимые КС, рассчитанные между значениями специфических антител различных изотипов в слюне, сыворотке и назальном секрете и остальными ПИС, предварительно распределив их в 4 группы. В группу 1 включены показатели, для которых КС были статистически значимы как «до» ( $R_1, p_1$ ), так и «после» ( $R_2, p_2$ ); в группу 2 – показатели, для которых КС были статистически значимы только в первом обследовании ( $R_1, p_1$ ); в группу 3 – показатели, для которых КС были статистически значимы только во втором обследовании ( $R_2, p_2$ ); в группу 4 вошли показатели, корреляции между которыми были статистически незначимыми и «до» и «после», но оказались значимыми при расчете КС между преобразованными данными D ( $R_D, p_D$ ).

При таком подходе в группе 1 оказалась одна КС между AtS.a. и AtKl.pn. A-изотипа в слюне с  $R_1=0,76$  ( $p_1=0,046$ ),  $R_2=0,89$  ( $p_2=0,007$ ) и статистически значимая КС между их значениями D ( $R_D=0,88$ ,  $p_D=0,008$ ).

Группа 2 содержала 17 КС, из которых только одна корреляция между величинами D имела статистически значимую оценку ( $R_D=0,88$ ,  $p_D=0,008$ ) между показателями AtS.a. G-изотипа в сыворотке и слюне. Параметры корреляции между этими же показателями в первом обследовании –  $R_1=0,90$ ,  $p_1=0,037$ .

Остальные 16 КС не имели статистически значимых оценок между значениями D соответствующих показателей иммунного статуса. Три КС из 16-ти включали только показатели специфического гуморального иммунитета: IgA AtKl.pn., IgG AtS.a. и AtKl.pn. в назальном секрете и IgM AtKl.pn. и AtS.a. в сыворотке, с диапазоном параметров  $0,93 \leq R_1 \leq 0,97$  и  $0,005 \leq p_1 \leq 0,008$ . Пять КС из 16-ти отражали связь показателей AtS.a. и AtKl.pn. A и G изотипов в слюне и сыворотке с ИРИ. Значения коэффициентов корреляции лежали в диапазоне  $0,81 \leq R_1 \leq 0,97$  с  $0,005 \leq p_1 \leq 0,049$ . В двух случаях были выявлены КС между показателями специфического сывороточного иммунитета и относительными показателями клеточного иммунитета: IgM AtS.a. – CD4<sup>+</sup>, ( $R_1=0,94$ ) и IgA AtKl.pn. – Лф, ( $R_1=-0,94$ ) с  $0,005 \leq p_1 \leq 0,014$ . Уровень общего IgM в сыворотке крови коррелировал с четырьмя показателями специфического иммунитета: с IgG и IgA AtKl.pn. назального секрета с одинаковыми значениями  $R_1=-0,95$ ,  $p_1=0,014$  и с IgM AtS.a. и AtKl.pn. в сыворотке ( $0,84 \leq R_1 \leq 0,89$ ,  $0,015 \leq p_1 \leq 0,019$ ). Уровень общего IgA в сыворотке крови коррелировал с уровнем IgM AtS.a. в сыворотке ( $R_1=-0,77$ ,  $p_1=0,041$ ) и IgG AtS.a. в слюне ( $R_1=0,76$ ,  $p_1=0,049$ ).

В группу 3 вошли 7 КС между показателями специфического иммунитета: IgG, IgA, IgM AtS.a. и AtKl.pn. в сыворотке (3 связи), в назальном секрете (5 связей) и в слюне (1 связь) и показателями клеточного иммунитета: CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup> (как относительные величины, так и абсолютные), а также 2 КС между перечисленными показателями специфического иммунитета и уровнем общего сывороточного IgA. Для всех КС абсолютные значения коэффициента корреляции лежали в диапазоне  $0,86 \leq R_2 \leq 0,97$  с  $0,005 \leq p_2 \leq 0,037$ . Одна пара показателей имела дополнительно статистически значимую КС, рассчитанную для преобразованных данных D: IgG AtKl.pn. в назальном секрете – общий сывороточный IgA с  $R_D=0,97$  и  $p_D=0,005$ .

В группу 4 вошли пять КС, полученных при анализе динамических характеристик показателей иммунитета. При этом статистически значимые КС для этих показателей, рассчитанные по данным первого и второго обследования, отсутствовали. В этих связях, с одной стороны находились показатели специфического иммунитета (IgG, IgA и IgM AtS.a.



и АТКl.pn. в слюне и сыворотке), а с другой стороны – показатели клеточного иммунитета ( $CD8^+$ ,%,  $CD16^+$ ,%,  $CD19^+$ ,%, ИРИ). Абсолютное значение RD этих связей лежит в диапазоне 0,82–0,97 с  $0,005 \leq p_D \leq 0,037$ .

**Обсуждение.** При оценке статистических связей между показателями специфических АТS.a и АТКl.pn., значения которых определяли в сыворотке, слюне и назальном секрете, в общей сложности было выявлено 35 статистически значимых корреляций. Из них 27 (77,1%) были получены при анализе исходных данных первого и второго исследования, а 8 (22,9%) – при расчете корреляционных связей между преобразованными данными – динамическими характеристиками параметров иммунитета (D). Из этих 8-ми корреляций, три связи (37,5%) приходились на показатели, для которых уже существовали статистически значимые КС либо «до» (1 связь), либо «после» (1 связь), либо «до» и «после» (1 связь). Пять связей (62,5%) между значениями D показателей специфического иммунитета и значениями D показателей клеточного иммунитета сопровождалась отсутствием статистически значимых КС как «до», так и «после».

Таким образом, показано, что при анализе результатов исследования «до – после» расчет коэффициентов корреляции между предложенными нами динамическими характеристиками показателей иммунитета позволяет получить дополнительную информацию о статистически значимых связях между различными компонентами иммунной системы. Биологический смысл корреляции между динамическими характеристиками двух показателей иммунитета заключается в одновременном пропорциональном изменении значений двух показателей иммунитета у каждого объекта данного исследования. Можно предположить, что именно «динамические корреляции» отражают реакцию иммунной системы на действие внешних факторов, одним из которых в нашем примере является вакцина ВП-4.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Степаненко Р.Н., Скалько Ю.И., Кузнецов В.А. и др. Иммунология, 1989, № 5, 45-49.
2. Феофанова Т.В., Серова Т.А., Бишева И.В., Краснопрошина Л.И. XXI Российский национальный конгресс «Человек и лекарство» Сборник материалов конгресса. Москва, 7–11 апреля 2014 г. с.177.

### THE NEW APPROACH TO THE USE OF CORRELATION ANALYSIS IN THE STUDY OF THE DYNAMICS OF IMMUNOLOGICAL PARAMETERS

Feofanova T. V.<sup>1</sup>, Serova T. A.<sup>2</sup>, Bisheva I. V.<sup>2</sup>,  
Foshina E. P.<sup>2</sup>, Skhodova S. A.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>FSBO SSC Institute of immunology of Federal medical-biological Agency of Russia;

<sup>2</sup>FSBSO Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia

The conversion of the data dynamic monitoring of a group of objects with the subsequent use of its results for the calculation of pair correlations is suggested. This new approach was tested on data from immunological studies “before – after”, where the changes in indicators of immunity in the group of patients during vaccinothrapy were studied. It is shown that this approach allows obtaining the additional information on the changes in the immune network.

## АНТИИДИОТИПИЧЕСКИЕ АНТИТЕЛА К ТИРЕОГЛОБУЛИНУ КАК МАРКЕР МЕТАСТАЗИРОВАНИЯ ПРИ РАКЕ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Храмова Т. В.<sup>1</sup>, Вараксин В. В.<sup>2</sup>, Кругликова С. М.<sup>1</sup>,  
Сухих А. С.<sup>1</sup>, Черных А. В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБОУ ВПО «Удмуртский государственный университет»; <sup>2</sup>БУЗ УР «РКОД  
им. С. Г. Примушко МЗ УР», Ижевск, Россия

Существующие дооперационные методы обнаружения метастазов при раке щитовидной железы обладают невысокой эффективностью и высоко инвазивны. Поэтому актуальным является поиск лабораторных маркеров, которые с высокой надежностью будут указывать на наличие метастазов, в том числе скрытых, при раке щитовидной железы. Целью данной работы являлось исследование возможности использования антиидиотипических антител против антител к тиреоглобулину в качестве маркера метастазирования при раке щитовидной железы. Было обнаружено, что используя уровень аутоантител к тиреоглобулину и антиидиотипических антител к аутоантителам к тиреоглобулину в паре, можно надежно дифференцировать рак щитовидной железы с метастазами и рак щитовидной железы без метастазов. Более того, высокий уровень антиидиотипических антител к аутоантителам к тиреоглобулину больных раком без обнаруживаемых метастазов может быть маркером неблагоприятного прогноза.

*Ключевые слова:* антиидиотипические антитела, метастазы, рак щитовидной железы, тиреоглобулин.

Особенность рака щитовидной железы заключается в том, что при условии отсутствия метастазов и при полном удалении опухоли вероятность рецидива низка. Поэтому своевременное обнаружение метастазов может позволить перевести эту патологию в разряд безрецидивных. Кроме того, оценка наличия метастазов до операции позволит выбрать адекватный, по возможности органосохраняющий объём хирургического вмешательства. Существующие дооперационные методы обнаружения метастазов при раке щитовидной железы обладают невысокой эффективностью и высоко инвазивны. Поэтому актуальным является поиск лабораторных маркеров, которые с высокой надежностью будут указывать на наличие метастазов, в том числе скрытых, при раке щитовидной железы.

Сегодня известно, что одним из ключевых механизмов контроля пролиферации ткани является иммунная система [1]. Аутореактивные лимфоциты и продуцируемые ими аутоантитела ограничивают рост и пролиферацию тканей. В свою очередь, аутореактивные лимфоциты находятся под контролем антиидиотипических

лимфоцитов. Нарушение в системе регуляции, например, избыточная активность антиидиотипических лимфоцитов, может быть причиной опухолевого роста. Ранее нами был проведен сравнительный анализ уровня аутоантител к различным антигенам (тиреоглобулин, рецептор тиреотропного гормона, нативная ДНК, анионные белки эндотелия сосудов), а также и антиидиотипических антител к тиреоглобулину у больных раком щитовидной железы с метастазами и без метастазов. Достоверные различия между исследуемыми группами были выявлены в уровне антиидиотипических антител против антител к тиреоглобулину. Поэтому целью данной работы являлось исследование возможности использования антиидиотипических антител против антител к тиреоглобулину в качестве маркера метастазирования при раке щитовидной железы.

Все исследованные больные раком щитовидной железы находились на стационарном лечении в БУЗ УР РКОД им. С. Г. Примушко МЗ УР, г. Ижевск. Кровь у больных забирали до операции. В плазме крови определяли уровень антиидиотипических антител (АИАТ)

против аутоантител к тиреоглобулину (ТГ) и уровень аутоантител (АУАТ) к тиреоглобулину с помощью тест-системы производства МИЦ «Иммункулус». Для определения антиидиотипических антител против антител к тиреоглобулину использовали принцип конкурентного ингибирования реакции связывания антител к тиреоглобулину с тиреоглобулином в присутствии исследуемой сыворотки. В качестве источника антител к тиреоглобулину использовали сыворотку от больных аутоиммунным тиреоидитом в эффективных для конкуренции разведениях. Анализируемые пробы предварительно истощали от антител к тиреоглобулину. Уровень исследуемых антител выражали в у.е. – оптическая плотность реакции связывания антител с антигеном.

Обнаружили, что у 43% больных раком щитовидной железы с подтвержденными метастазами в шейных или паратрахеальных лимфоузлах АИАТ против АУАТ к ТГ не определяются (группа I), у 57% выявлен относительно высокий уровень АИАТ против АУАТ к ТГ  $0,343 \pm 0,027$  у.е. (группа II). У больных раком щитовидной железы без метастазов уровень АИАТ против АУАТ к ТГ ( $0,185 \pm 0,083$  у.е.) ниже, чем у больных раком с метастазами. В 23% исследованных случаев не удается дифференцировать рак с метастазами от рака без метастазов.

Исследование уровня АУАТ к ТГ показало, что у больных раком щитовидной железы с метастазами он составил: в группе I –  $0,997 \pm 0,084$  у.е., в группе II –  $1,087 \pm 0,174$  у.е. Уровень

АУАТ к ТГ у больных раком без метастазов –  $0,794 \pm 0,038$  у.е. Обнаружено, что в тех случаях, где уровень АИАТ против АУАТ к ТГ не позволяет различить рак щитовидной железы с метастазами от рака без метастазов, дифференцировать данные состояния рака щитовидной железы можно с помощью уровня аутоантител к ТГ. Таким образом, используя уровень аутоантител к тиреоглобулину и антиидиотипических антител к аутоантителам к тиреоглобулину в паре, можно надежно дифференцировать рак щитовидной железы с метастазами и рак щитовидной железы без метастазов.

Более того, высокий уровень АИАТ против АУАТ к ТГ у больных раком без обнаруживаемых метастазов может быть маркером неблагоприятного прогноза. Так, у одного из исследованных больных с диагнозом папиллярный рак без метастазов мы обнаружили уровень АИАТ против АУАТ к ТГ, равный  $0,37$  у.е., что указывало на наличие метастазов. Действительно, менее чем через 4 месяца у данного пациента были обнаружены метастазы в лимфоузлах шеи.

Таким образом, уровень антиидиотипических антител к аутоантителам к тиреоглобулину может быть использован как маркер метастазирования в дифференциальной диагностике рака щитовидной железы.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Toomer K. H., Chen Z. // *Front Immunol.* 2014 Mar 18;5:116. doi: 10.3389/fimmu.2014.00116. eCollection 2014. Review. PMID: 24672527

### ANTI-IDIOTYPIC ANTIBODIES TO ANTI-THYROGLOBULIN ANTIBODIES CAN DETECT METASTATIC THYROID CANCER

**Khramova T. V.<sup>1</sup>, Varaksin V. V.<sup>2</sup>, Kruglikova S. M.<sup>1</sup>,  
Sukhikh A. S.<sup>1</sup>, Chernykh A. V.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Udmurt State University; <sup>2</sup>Primushko Regional Clinical Oncology Center  
of the Ministry of Health of the Udmurt Republic, Izhevsk, Russia

Existing methods for preoperative detection of metastases in cancer of the thyroid gland have low efficiency and highly invasive. Therefore it is urgent to find laboratory markers which will indicate metastatic thyroid cancer with high reliability. The aim of this study was to investigate the possibility of using anti-idiotypic antibodies against antibodies to thyroglobulin as a marker of metastatic thyroid cancer. It has been found that it is possible to reliably differentiate thyroid cancer without metastasis and metastatic thyroid cancer by using the level of anti-thyroglobulin autoantibodies and the level of anti-idiotypic antibodies against anti-thyroglobulin autoantibodies in pairs. Moreover, high level of anti-idiotypic antibodies against anti-thyroglobulin autoantibodies in patients without detectable metastases may be a marker of poor prognosis.

**Keywords:** anti-idiotypic antibodies, metastasis, thyroid cancer, thyroglobulin.

## КОНСТРУИРОВАНИЕ И ОПТИМИЗАЦИЯ ИНТЕРПРЕТАЦИИ РЕЗУЛЬТАТОВ НЕИНСТРУМЕНТАЛЬНОГО СТОЛБНЯЧНОГО СЕРОЛОГИЧЕСКОГО ТЕСТА

Храмцов П. В.<sup>1,2</sup>, Бочкова М. С.<sup>1</sup>, Раев М. Б.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>ФГБУН «Институт экологии и генетики микроорганизмов»; <sup>2</sup>ФГБОУ ВПО «Пермский государственный национальный исследовательский университет», Пермь, Россия

Сконструирована и оптимизирована неинструментальная дот блот тест-система для полуколичественного определения столбнячного антитоксина в сыворотке крови человека при помощи углеродных наночастиц, функционализированных G белком стрептококка. Твердофазный иммуносорбент представляет собой нитроцеллюлозную мембрану, сенсibilизированную столбнячным анатоксином в концентрации 0,1 мг/мл. Процедура анализа предполагает последовательную инкубацию иммуносорбента в исследуемой сыворотке крови и диагностикуме. Считывание результатов производится при помощи сканирования поверхности иммуносорбента и последующего программного анализа полученного изображения. Концентрация антитоксина выражается в условных единицах относительно калибровочного графика и характеризует наличие защитного титра антител и степень защиты.

*Ключевые слова:* серологическая диагностика, валидация, столбняк.

В настоящее время широко распространены приборные методы иммуноанализа, позволяющие производить количественное определение аналита (иммуноферментный (ИФА), иммунофлуоресцентный (ИФЛА), хемилюминисцентный анализ (ИХЛА)). Применение таких методов ограничено рамками лабораторий, оснащенных соответствующими приборами, имеющими в своем штате персонал с достаточной квалификацией. Проблема «зависимости от прибора» не является столь острой для развитых стран с высоким уровнем финансирования системы диагностических лабораторий и развитой логистикой. В то же время, для развивающихся стран оснащение лабораторий необходимыми считывающими приборами и налаживание системы транспортировки образцов до этих лабораторий является существенной проблемой, особенно если территория страны значительна. Это стимулирует разработку методов бесприборного тестирования: простых, оперативных, позволяющих использовать их повсеместно, независимо то уровня технического оснащения. К тест-системам, пригодным для реализации таких методов, относятся иммунохроматографические, иммунофильтрационные, дот блот тесты, объединенных общим термином «point-of-care» (POC). Такие тесты весьма популярны не только в развивающихся, но и в развитых странах, ввиду отличного соот-

ношения простоты постановки и аналитических характеристик. Несмотря на это количественные и полуколичественные тесты в основном остаются инструментальными, а большинство POC тестов являются качественными. Полуколичественными является и ряд неинструментальных агглютинационных, флокуляционных тестов, однако их постановка достаточно трудоемка (необходимость титрования, инактивации, истощения пробы) и, зачастую, длительна. Современный научно-технический уровень позволяет создавать диагностические инструменты, сочетающие в себе преимущества традиционных инструментальных методик, таких как ИФА и простоту POC тест-систем. Яркими примерами подобных инструментов являются тест-наборы ImmunoComb и CombScan (Alere, США), ViraStripe (Viramed, Германия), а также специализированные устройства и программно-аппаратные комплексы для обработки результатов широкого спектра форматов POC, стоимость которых значительно ниже, чем например у традиционного ИФА-ридера: Scannex (Норвегия), EDCO (США). Положительными сторонами применения средств цифровой обработки является возможность получения более объективных результатов, облегчение обмена данными между медицинскими учреждениями, расширения возможностей POC. Несомненно, перечисленные устройства оцифровки изобра-

жений могут быть столь же недоступны в развивающихся странах, как и ИФА- или ИФЛА-ридеры, поэтому в настоящее время в целом ряде научных работ для анализа данных используется обычный офисный сканер, а обработка данных производится при помощи специализированных бесплатных программ (ImageTool, разработка университета штата Техас, США, imageJ, создана в Национальном институте здоровья, США), что значительно облегчает внедрение технологии в практику.

**Целью настоящей работы** являлось конструирование неинструментальной дот блот тест-системы, предназначенной для полуколичественного определения антител к столбнячному анатоксину.

Ранее в нашей лаборатории были разработаны дот блот тесты, предназначенные для определения титров поствакцинальных антител к дифтерии, столбняку и коклюшу в одной постановке [1]. В ходе обсуждения результатов работы профильными специалистами была отмечена излишняя громоздкость тест-системы, связанная с необходимостью титрования исследуемой пробы. Для устранения этой проблемы и упрощения процедуры анализа было принято решение создать диагностическую систему, которая позволит полуколичественно определять целевые антитела при использовании единственного разведения исследуемой сыворотки крови. Технической основой для реализации нашей идеи стало применение метода цифровой обработки результатов иммуноанализа.

**Методы.** Образцы сывороток крови вакцинированных от столбняка детей были получены из ГДКП № 5, г. Перми. Сыворотки крови хранили при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$ . Концентрацию антител к столбнячному анатоксину сыворотках определяли при помощи ИФА-набора («Euroimmun», Германия).

**Процедура иммуноанализа.** На диски из нитроцеллюлозной мембраны диаметром 5 мм («Bio-Rad», США) сорбировали столбнячный анатоксин («Микроген», Россия), разведенный до целевой концентрации в нейтральном фосфатном буфере (ЗФР). Синтезированный таким образом иммуносорбент трехкратно промывали ЗФР с 0,05% Твином-20 (ЗФРТ). На один цикл промывки каждого диска уходило 5 мин и 300 мкл буфера. Затем сенсibilизированные анатоксином диски инкубировали со 100 мкл исследуемой сывороткой крови, разведенной в ЗФРТ с 1% БСА. После очередной промывки

производили детекцию антител к анатоксину при помощи диагностикума, представляющего собой суспензию углеродных наночастиц, конъюгированных с G белком стрептококка [2]. Диски вновь промывали описанным образом и высушивали. По окончании анализа в центре диска проявлялось темное пятно, степень окрашивания которого зависела от концентрации антител в образце. Поверхность дисков сканировали при помощи сканера Canon Lide 600f (программа для сканирования Canoscan Toolbox последней версии, режим сканирования: оттенки серого, разрешение 600 dpi). Полученные изображения обрабатывали при помощи программы imageJ (НИН, США). Программную обработку каждого диска проводили следующим образом: при помощи инструмента Measure детектировали степень окрашивания в зоне сорбции анатоксина и в трех прилегающих участках (фон). Далее из показателя интенсивности окрашивания в зоне сорбции анти-лиганда вычитали среднее значение интенсивности окрашивания фона. Полученное значение характеризовало уровень специфического сигнала для каждого из дисков. Именно это значение в дальнейшем использовалось для построения калибровочных графиков.

Основной целью разработки системы полуколичественной детекции антител к столбнячному анатоксину являлось создание простого, массово применимого теста для контроля эффективности вакцинации от столбняка. В связи с этим результат анализа должен характеризовать состояние гуморального иммунитета к столбняку у пациента (серопозитивный или серонегативный, какова приблизительная длительность защиты, если серопозитивный). В связи с этим полуколичественная оценка иммунитета к столбняку производилась относительно трех опорных значений концентрации антитоксина в сыворотке:  $>0,1$  МЕ/мл – серопозитивный, 0,1-0,5 МЕ/мл – кратковременная защита, 0,5 МЕ/мл – 1 МЕ/мл – необходима ревакцинация или серологический контроль через 3 года,  $>1$  МЕ/мл – необходима ревакцинация или серологический контроль через 5 лет и более.

В ходе оптимизации анализа мы добивались наибольшей разрешающей способности именно в этом диапазоне концентраций антитоксина.

Для построения калибровочных графиков использовали 1-й международный стандарт ВОЗ препарата столбнячного анатоксина (TE-3, NIBSC, Соединенное Королевство). Полученные

калибровки приводили к виду логистической кривой с 5 параметрами при помощи онлайн-сервиса [elisaanalysis.com](http://elisaanalysis.com). Оценку параллелизма и линейности анализа проводили в соответствии с протоколом, приведенным в работе [3].

**Результаты.** В ходе исследования был протестирован ряд сенсibiliзирующих концентраций столбнячного анатоксина (0,2 мг/мл, 0,1 мг/мл, 0,05 мг/мл, 0,025 мг/мл, 0,012 мг/мл). Было установлено, что со снижением концентрации анатоксина на твердой фазе происходит более интенсивное «насыщение» центров специфического связывания иммуносорбента. Вследствие этого показатели диагностического сигнала достигают значений, близких к максимальным, при незначительном увеличении концентрации антител в пробе, что приводит к неоптимальной форме калибровочной кривой. Наилучшая разрешающая способность анализа была достигнута при сенсibiliзации твердой фазы анатоксином в концентрации 0,05 мг/мл. Схожий эффект имеет увеличение длительности инкубации с исследуемой сывороткой. Из трех использованных в работе режимов инкубации: 15 мин., 30 мин., 60 мин., оптимальным был признан первый.

Рабочее разведение сыворотки подбирали в соответствии с целевым диапазоном концентраций анитоксина: от 0,1 до 1 МЕ/мл. В соответствии с калибровочным графиком, достаточная воспроизводимость анализа (коэффициент вариации < 10%) наблюдалась в диапазоне концентраций калибратора от 0,007 МЕ/мл и выше. Таким образом, для получения точного результата, сыворотки необходимо разводить 1:10.

Для оценки линейности и параллелизма использовали рассчитанное уравнение логисти-

ческой кривой с пятью параметрами (ввиду его громоздкости мы не будем приводить его целиком, а лишь укажем значения параметров:  $a=123,955$ ,  $b=-0,424$ ,  $c=0,037$ ,  $d=-3,135$ ,  $g=2,418$ , коэффициент детерминации  $R^2=0,991$ ). Для оценки параллелизма ряд сывороток крови с концентрациями анитоксина в диапазоне от 0,1 до 1 МЕ/мл был исследован в 4-х повторностях каждая. Коэффициенты вариации для рассчитанных относительно уравнения логистической кривой концентраций анализа были ниже 20%, что свидетельствует о наличии параллелизма [3]. Аналогичным образом была продемонстрирована линейность анализа в диапазоне от 0,007 МЕ/мл и выше.

Таким образом, в ходе выполнения исследования была сконструирована неинструментальная диагностическая система для полуколичественного определения столбнячного анитоксина в сыворотке крови человека, а также оптимизирована процедура анализа. Особенностью разработанного теста является достаточно высокая оперативность (длительность анализа менее полутора часов), простота, возможность документирования результатов. Особенностью теста является применение системы обработки изображений для количественной оценки уровня аналитического сигнала и повышения объективности интерпретации результатов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Храмов П. В. // Российский иммунологический журнал. – Т. 8 (17). – № 3. – 2014. – С. 926-929.
2. Раев М. Б. Нанобиотехнологии в неинструментальной иммуноаналитике. Екатеринбург: УРО РАН – 2012. – 140 с.
3. Plikaytis B. et al. // Journal of Clinical Microbiology. – 1994. – V.32. – Is.10. – P. 2441-2447.

### CONSTRUCTION AND OPTIMIZATION OF THE RESULTS' INTERPRETATION FOLLOWING THE NON-INSTRUMENTAL SEROLOGICAL TEST FOR TETANUS TOXOID

**Khramtsov P. V.<sup>1,2</sup>, Bochkova M. S.<sup>1</sup>, Rayev M. B.<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>FSBSI Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms UB RAS; <sup>2</sup>FSBEI HPE Perm State National Research University,

Non-instrumental dot blot test-system for semi-quantitative determination of tetanus toxoid in human blood serum using carbon nanoparticles functionalized with streptococcal G protein was constructed and optimized. Solid-phase immunosorbent is represented by nitrocellulose membrane sensitized by tetanus toxoid in a concentration of 0,1 mg/mL. Analytic procedure suggests sequential immunosorbent incubation in blood serum and diagnosticum. Reading off the results is realized via the surface immunosorbent scanning and subsequent program analysis of the resulting image. Toxoid concentration is expressed in conventional units relatively to calibration curve and indicates the presence of protective antibody titers and degree of protection.

*Keywords:* serological diagnosis, validation, tetanus.

## **Раздел 4**

# **ИММУННЫЕ МЕХАНИЗМЫ**

## РЕГУЛЯТОРНЫЕ И ЭФФЕКТОРНЫЕ СУБПОПУЛЯЦИИ Т-ЛИМФОЦИТОВ ПРИ АТОПИЧЕСКОМ ДЕРМАТИТЕ У ДЕТЕЙ, АССОЦИИРОВАННЫМ С ГРИБАМИ РОДА КАНДИДА

Агафонова Е. В., Велижинская Т. А.

ГОУ ВПО Казанский государственный медицинский университет, Казань, Россия

У детей с атопическим дерматитом, осложненным кандидозной инфекцией (АДКИ), проводилось изучение популяций и субпопуляций Т-лимфоцитов – CD3<sup>+</sup>19<sup>-</sup>, CD3<sup>+</sup>4<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>8<sup>+</sup>, CD3<sup>-</sup>19<sup>+</sup>, CD16/56<sup>+</sup>3<sup>-</sup>, CD16/56<sup>+</sup>3<sup>+</sup>, CD3<sup>-</sup>8<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>4<sup>-</sup>8<sup>-</sup>, CD4<sup>+</sup>8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>25<sup>hi</sup>, CD4<sup>+</sup>62L<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>62L<sup>-</sup>. Показано, что Т-лимфопения при АДКИ сочеталась со снижением основных субпопуляций Т-лимфоцитов CD3<sup>+</sup>4<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>8<sup>+</sup>. Выявлено снижение CD4<sup>+</sup>лимфоцитов, экспрессирующих рецепторы хоминга (CD62L<sup>+</sup>4<sup>+</sup>), и повышение субпопуляции эффекторов, мигрирующих в ткани (CD4<sup>+</sup>62L<sup>-</sup>). Также при АДКИ выявлено повышение субпопуляций Т-лимфоцитов с регуляторной/супрессорной активностью – CD16/56<sup>+</sup>3<sup>+</sup>, CD3<sup>-</sup>8<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>4<sup>-</sup>8<sup>-</sup>, CD4<sup>+</sup>8<sup>+</sup> что ассоциируется с хронизацией кандидозной инфекции

**Ключевые слова:** атопический дерматит осложненный кандидозной инфекцией, дети, регуляторные и эффекторные субпопуляции Т лимфоцитов.

В формирование и реализации атопического дерматита (АД) у детей ключевая роль принадлежит аллергическому воспалению с вовлечением в процесс различных иммунокомпетентных клеток. Иммунными нарушениями определяется не только тяжесть АД, но и формирование осложненных форм, в частности связанных с персистенцией грибковых патогенов [1]. Особое внимание в иммунопатогенезе различных заболеваний уделяется изучению регуляторных субпопуляций лимфоцитов, обладающих супрессорной/регуляторной активностью. В настоящий момент внимание исследователей приковано к трем основным субпопуляциям регуляторных клеток: CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup> -Т-лимфоцитам, Th3 и Tr1, или индуцибельным регуляторным клеткам (T<sub>ir</sub>) [2, 3]. В последних исследованиях предлагается концепция участия регуляторных Т-клеток, оказывающих воздействие на Th1 и Th 2 лимфоциты в аллергическом иммунном ответе [2]. В связи с вышеизложенным **целью исследования** – изучить популяции и субпопуляции лимфоцитов с оценкой роли некоторых регуляторных субпопуляций при АД у де-

тей, осложненным кандидозной инфекцией (АДКИ).

**Материалы и методы.** Обследованы 66 детей в возрасте от 3 до 15 лет с АДКИ. АД характеризовался преимущественно тяжелым (83,3%; SCORAD более 60) и среднетяжелым течением (16,7%; SCORAD 30–60). Диагностика кандидоза включала культуральные микологические исследования и наличие повышенного уровня маннанового антигена *Candida albicans* (метод иммуносенсоров, Казанский НИИЭМ) в сыворотке крови. В контроле обследована группа здоровых детей (сопоставимые по возрасту, N=26). Популяции и субпопуляции лимфоцитов исследовались методом ПЦФ с применением двух и трехпараметрического анализа выделялись линейные – CD3<sup>+</sup>19<sup>-</sup>, CD3<sup>+</sup>4<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>8<sup>+</sup>, CD3<sup>-</sup>19<sup>+</sup>, CD16/56<sup>+</sup>3<sup>-</sup> и субпопуляции с регуляторной активностью – CD16/56<sup>+</sup>3<sup>+</sup>, CD3<sup>-</sup>8<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>4<sup>-</sup>8<sup>-</sup>, CD4<sup>+</sup>8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>25<sup>hi</sup>, CD4<sup>+</sup>62L<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>62L<sup>-</sup>. Статистическая обработка материала проводилась методами вариационной статистики (M, m, t-критерию Стьюдента).

**Результаты и обсуждение.** По сравнению с контрольной группой при АДКИ ре-



гистрировалась лейкопения ( $4370,0 \times 10^6/\text{л}$ ,  $p < 0,05$ ) и лимфопения ( $1830,0 \times 10^6/\text{л}$ ;  $p < 0,05$ ). При исследовании популяционного профиля лимфоцитов имело место снижение  $\text{CD}3^+19^-$  ( $61,42\%$ ;  $1123,0 \times 10^6/\text{л}$  –  $p < 0,05$ ,  $p < 0,05$ ) и увеличением  $\text{CD}3^+56^+/16^+$ -лимфоцитов ( $20,16\%$ ;  $p < 0,05$ ). Изучение линейных субпопуляций Т-лимфоцитов выявило снижение  $\text{CD}3^+4^+$  ( $31,45\%$ ;  $575,9 \times 10^6/\text{л}$  –  $p < 0,05$ ;  $p < 0,05$  соответственно) и субпопуляции СТЛТ-лимфоцитов ( $510,2 \times 10^6/\text{л}$ ;  $p < 0,05$ ). Таким образом, Т-лимфопения при АДКИ сочеталась со снижением основных субпопуляций Т-лимфоцитов. В популяции  $\text{CD}4^+$ -лимфоцитов нами изучались субпопуляции –  $\text{CD}62\text{L}^+4^+$ ,  $\text{CD}62\text{L}^+4^-$ .  $\text{CD}62\text{L}^+4^+$ -субпопуляция Т-хелперов, экспрессирующая рецепторы хоминга – неактивированные Т-хелперы, по некоторым данным, популяция “наивных” лимфоцитов [4].  $\text{CD}4^+62\text{L}^-$  высокодифференцированные эффекторы, мигрирующие в очаги воспаления и характеризующихся высокой способностью к продукции  $\text{IFN-}\gamma$ , что ассоциируется с Th1 девиацией иммунного ответа. При АДКИ регистрировалось снижение субпопуляции  $\text{CD}62\text{L}^+4^+$  ( $19,41\%$ ;  $357,2 \times 10^6/\text{л}$  –  $p < 0,05$ ,  $p < 0,05$ ) и повышение  $\text{CD}4^+62\text{L}^-$  ( $18,05\%$ ;  $329,6 \times 10^6/\text{л}$  –  $p < 0,05$ ,  $p < 0,001$ ). Потеря селективного маркера придает субпопуляции  $\text{CD}62\text{L}^+4^+$  – новые качества с приобретением свойств клеток-эффекторов, мигрирующих в органы. По видимому, повышение миграции субпопуляции  $\text{CD}4^+$  в кожу при АДАГРС связано с прогрессирующей Т-лимфопенией и уменьшением субпопуляции Т-хелперов. У детей с АДКИ регистрировалось достоверное нарастание субпопуляции  $\text{CD}4^+\text{CD}25^+\text{Hi}$  ( $8,47\%$ ;  $82,9 \times 10^6/\text{л}$  –  $p < 0,05$ ,  $p < 0,05$ ). Важнейшей функцией Treg является их сдерживающая роль в развитии иммунного воспаления [2], однако в конечном итоге эта, в определенной степени компенсаторная реакция, приводит к негативным последствиям в виде ослабления эффективности протективного иммунитета, способствуя генерализации и хронизации инфекции, что является значимым фактором иммунологических нарушений при АДКИ. При изучении субпопуляции  $\text{CD}16/56^+3^+$  регистрировалось ее повышение в относительных ( $12,86\%$ ,  $p < 0,001$ ) значениях по сравнению с группой контроля. Большинство исследователей считают популяцию НКТ ответственной за реализацию

цитокинового взрыва [5], в том числе, включающего повышенную выработку интерлейкинов Th2 профиля в ответ на антигенную стимуляцию. Другие исследователи относят НКТ лимфоциты к популяции Т-регуляторных клеток, приобретающих супрессорные характеристики в процессе антигенной стимуляции. В работах последних лет установлена роль ключевого транскрипционного фактора FOXP3 в управлении регуляторной функции iNKT, что дает основание отнести их к адаптивным регуляторным клеткам [5]. Таким образом при АДКИ нами продемонстрировано нарастание адаптивных субпопуляций Т-лимфоцитов с регуляторной/супрессорной активностью, что по видимому является одним из факторов нарушения иммунопатогенеза и прогрессированию осложненного течения АД. При изучении “малых” минорных субпопуляций лимфоцитов выявлено повышение  $\text{CD}3^+8^+$  ( $9,16\%$ ;  $112,5 \times 10^6/\text{л}$  –  $p < 0,05$ ,  $p < 0,05$ ). Клетки с фенотипом  $\text{CD}8^+3^-$  рассматривают как субпопуляцию НК-клеток с регуляторными функциями [2, 5]. В литературе также обсуждается вопрос о функциональных свойствах этой субпопуляции, им приписываются функции Th3 лимфоцитов, Т супрессоров, НК подобную активность, не исключают также, что эти примитивные (по репертуару Т клеточного рецептора) клетки, способны изменять свой фенотип при изменении цитокинового фона. В последние годы субпопуляции  $\text{CD}3^-\text{CD}8^+$  отводят функции индуцированных на периферии регуляторных Т-лимфоцитов. Также при АДКИ регистрировалось увеличение субпопуляции  $\text{CD}4^+8^+$  ( $14,68\%$ ;  $0,3 \times 10^6/\text{л}$  –  $p < 0,05$ ,  $p < 0,05$ ). Имеются сообщения о выбросе из тимуса ранних клеток с фенотипом кортикальных тимоцитов при иммунодефицитных состояниях, по некоторым данным функционально данная популяция клеток недостаточна активна. Вместе с тем в работах последних лет показано что циркулирующие  $\text{CD}4^+\text{CD}8^+$  Т-клетки содержат зрелые эффекторные лимфоциты, специфичные для антигенов и принимают участие в адаптивном иммунном ответе против инфекционных возбудителей. По видимому, выраженное повышение субпопуляции  $\text{CD}4^+\text{CD}8^+$  в нашем исследовании определяется 2 механизмами – как выбросом их из тимуса, что отражает мобилизацию иммунной системы, так и на-

растанием доли эффекторных лимфоцитов при персистенции грибковых патогенов. Наряду с популяцией DP выделяется и минорная субпопуляция – ”естественные подавители” CD3<sup>+</sup>4<sup>-</sup>8<sup>-</sup> (DNCD3 клетки) [3, 5]. DNCD3 клетки составляют около 1-3% лимфоцитов периферической крови у взрослых. нами выявлено достоверное повышение субпопуляции CD3<sup>+</sup>4<sup>-</sup>8<sup>-</sup> при АДКИ (2,32%: 42,2±5,8 – p<0,05, p<0,05). Иммунофенотипические исследования показали, что одна из основных фракций DNCD3 имеет фенотип клеток памяти. Высказывается предположение, что DNCD3, избегая негативного отбора в тимусе, мигрируют на периферию, образование DNCD3 может происходить и путем повторной дифференцировки CD3<sup>+</sup>4<sup>+</sup>-тимоцитов. Стимуляция грибковыми антигенами в присутствии ИЛ-2 активированных CD4<sup>+</sup> Т-клеток приводит к увеличению данной субпопуляции на периферии и повышенной выработке ими супрессорного цитокина ИЛ-10. Указанные двойные негативные тимоциты входят в состав субпо-

пуляции CD4<sup>-</sup> Т-клеток, отнесенных к фенотипу Th3 регуляторных клеток. Таким образом, при АД у детей осложненном персистенцией грибковых патогенов один из возможных механизмов супрессии антигенпротективного иммунного ответа, связан с накоплением индуцированных на периферии Т-лимфоцитов с регуляторной активностью, что является одним из иммуносупрессорных механизмов способствующих хронизации кандидозной инфекции.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Снорская Е.С. // Лечащий врач.–2012.– N4.– С. 10-15
2. Свиридова В.С., Кологривова Е.Н., Проница Н.А. и др. // Бюллетень сибирской медицины.– N1.– 2007.– С. 6-11
3. Szegedi A., Barth S., Nagy G. et al. //Br. J. Dermatol.– 2009.– V. 160, N 5.– P. 984-993.
4. You S., Slehoffer G., Barriot S. et al. //ProcNatlAcadSci.– 2004;101 Suppl 2:-P. 14580-5.
5. Iwamura C., Shinoda K., Endo Y. et al. Prow-NatlAcad. Sci 2012;109 (42):-P. 16992-7.

### REGULATORY AND EFFECTOR SUBPOPULATIONS OF T-LYMPHOCYTES IN ATOPIC DERMATITIS IN CHILDREN, ASSOCIATED WITH FUNGI OF THE GENUS *CANDIDA*

Agafonova E. V., Velizhinskaya T. A.

Kazan State Medical University, Kazan, Russia

In children with atopic dermatitis complicated by *Candida* infection (ADKI) conducted the study populations and subpopulations of T-lymphocytes – CD3<sup>+</sup>19<sup>-</sup>, CD3<sup>+</sup>4<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>8<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>19<sup>+</sup>, CD16/56<sup>+</sup>3<sup>-</sup>, CD16/56<sup>+</sup>3<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>8<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>4<sup>-</sup>8<sup>-</sup>, CD4<sup>+</sup>8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>25<sup>+</sup>hi, CD4<sup>+</sup>62L<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>62L<sup>-</sup>. It has been shown that T-lymphopenia ADKI when combined with the reduction in major subpopulations of T lymphocytes CD3<sup>+</sup>4<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>8<sup>+</sup>. Reduction of CD4<sup>+</sup> lymphocytes expressing receptors homminga (CD62L<sup>+</sup>4<sup>+</sup>) and increased effector subpopulation of migrating in the tissue (CD4<sup>+</sup> 62L<sup>-</sup>). Also, when ADKI found an increase subpopulations of T lymphocytes with regulatory/suppressive activity – CD16/56<sup>+</sup>3<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>8<sup>+</sup>. CD3<sup>+</sup>4<sup>-</sup>8<sup>-</sup>, CD4<sup>+</sup>8<sup>+</sup> is associated with chronicity of *Candida* infection.

## ОСОБЕННОСТИ ИММУНОЛОГИЧЕСКОГО СТАТУСА У ДЕТЕЙ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ С МЕТАБОЛИЧЕСКИМ СИНДРОМОМ

Азизова Н. Д.

*Республиканский специализированный научно-практический медицинский центр  
Педиатрии МЗ РУз, Ташкент, Узбекистан*

Изучены особенности изменения иммунологического статуса у 53 детей с БА и его взаимосвязи с другими проявлениями МС на фоне избыточной массы тела. Исследования показали повышение уровня иммунологических показателей в сыворотке крови у больных детей, и эти показатели могут рассматриваться как важнейшие факторы патогенетических механизмов формирования этих заболеваний. Предложенные дифференцированные схемы лечения с использованием препарата метформин и немедикаментозной терапией в комплексе традиционной терапии у детей БА школьного возраста с МС оказывает положительное влияние на клиническое течение заболевания, способствует улучшению иммунологических показателей приводящих к сокращению сроков пребывания больных в стационаре.

*Ключевые слова:* бронхиальная астма, дети, метаболический синдром, иммунологические параметры.

**Актуальность.** Жировая ткань является источником синтеза белка  $\alpha$ -фактора некроза опухоли ( $\alpha$ -ФНО). По данным ряда авторов повышение уровня ФНО- $\alpha$  имеет прямую зависимость со степенью ожирения, а также отрицательно коррелирует с активностью липопротеинлипазы в жировой ткани. В проведенном нами исследовании средний уровень ФНО- $\alpha$  не имел достоверных различий у больных с нормальной, избыточной массой тела и ожирением [3].

Метаболический синдром влияет на течение БА, усиливая бронхоспастический синдром. Течение, степень тяжести и лечение БА симпатомиметиками и глюкокортикостероидами также воздействуют на изменения структуры и гормонального статуса МС [2]. Развитие БА сопровождаются развитием иммунного дисбаланса, а именно изменением цитокинового спектра с повышением содержания в сыворотке крови провоспалительных цитокинов и снижением уровня противовоспалительных цитокинов. Роль липоцитов в развитии МС и атеросклероза до конца не выявлена, однако известно, что цитокины и адипокины оказывают прямое и не прямое действия на атерогенез, вызывают активацию тромбогенеза [4].

Возможно, что провоспалительные цитокины ФНО- $\alpha$ , ИЛ-6, ИЛ-1 $\beta$  играют не последнюю роль в развитии МС и АГ [1,5].

**Цель исследования.** Изучение особенностей цитокинового статуса у детей больных бронхиальной астмой с метаболическим синдромом.

**Материал и методы исследования.** Концентрацию цитокинов: интерлейкинов – ИЛ-1 $\beta$ ; ИЛ-4; ИЛ-6; ИЛ-8 определяли методом иммуноферментного анализа с использованием наборов реактивов производства ООО «Цитокин» (Санкт-Петербургский НИИ особо Чистых Биопрепаратов). Для реализации этого метода использованы два вида моноклональных антител с различной эпитопной специфичностью к ИЛ-1 $\beta$ ; ИЛ-4; ИЛ-6; и ИЛ-8.

Обследовано 53 детей БА с МС, средний возраст –  $10,44 \pm 0,2$  г. На момент включения в исследование среднее значение индекса массы тела (ИМТ) составило  $24,79 \pm 3,94$ , ОТ/ОБ –  $0,9 \pm 0,01$ . Группа сравнения состояла из 46 детей в возрасте от 6 до 14 лет (в среднем  $10,44 \pm 0,2$ г) нормальной массой тела. Первая группа больных находилась на стандартной терапии (в виде сочетания редуцированной по калориям диеты с адекватными физическими нагрузками), вторая – помимо стандартной

терапии получала препарат метформин. Критериями исключения были врожденная эндокринная патология, вторичная артериальная гипертензия (АГ), длительная гормональная терапия (более 1 месяца) сахарного диабета первого типа, а также возраст детей до 3 лет.

**Результаты исследования.** Обследовано 53 детей БА с МС, средний возраст –  $10,44 \pm 0,2$  г. На момент включения в исследование среднее значение индекса массы тела (ИМТ) составило  $24,79 \pm 3,94$ , ОТ/ОБ –  $0,9 \pm 0,01$ . Группа сравнения состояла из 46 детей в возрасте от 6 до 14 лет (в среднем  $10,44 \pm 0,2$  г) нормальной массой тела. Первая группа больных находилась на стандартной терапии (в виде сочетания редуцированной по калориям диеты с адекватными физическими нагрузками), вторая – помимо базисной терапии получала метформин.

Определение уровней сывороточных цитокинов в группах обследованных больных показали достоверное повышение концентрации, ФНО- $\alpha$ , ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-6, ИЛ-8 у больных II группы в сравнении с I группой. При наблюдении за детьми в течение 12 месяцев отмечены положительные изменения со стороны иммунологических показателей. Следует отметить, что наличие МС у больных с БА сопровождалось более высоким уровнем провоспалительной цитокинемии. При этом выявлены достоверные различия в содержании провоспалительных цитокинов в сравниваемых II группе больных в зависимости I группы.

При исследовании детей этих групп наблюдался ряд статистически достоверных отличий от показателей здоровых детей.

Во II группе, спустя 6 и 12 месяцев, иммунологический статус наблюдаемых детей, характеризовался достоверным снижением показателей ИЛ-1 $\beta$  –  $167 \pm 25$  и  $120,4 \pm 23$  соответственно по отношению к показателю I группы через 6 и 12 месяцев  $286 \pm 21$  и  $269 \pm 22$  соответственно, т.е. практически приблизились к контрольным значениям. Наблюдалась положительная достоверная динамика со стороны ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-8 и ФНО- $\alpha$  показателей по сравнению с детьми I группы ( $P$  от  $<0,01$  до  $<0,001$ ), однако оставалась выше контрольной величины.

Таким образом, проведенные исследования позволяют сделать заключение о том, что предложенные дифференцированные схемы лечения в группе детей БА с МС препаратом метформин в сочетании с немедикаментозной терапией детей, спустя 6 и 12 месяцев, приво-

дило, к снижению 2 раза частоты рецидивов заболеваний БА и стабилизацию иммунологических показателей. Число детей со сниженной фагоцитарной активностью сократилось в 2,5 раза. Комплексный подход в терапии не только вызывает клинический эффект, но и способствует восстановлению основных параметров провоспалительных и противовоспалительных цитокинов в сравнительно ранние сроки. Обобщая полученные данные, можно сказать, что у детей бронхиальной астмой с МС, изменения показателей иммунной системы могут рассматриваться как важнейшие факторы патогенетических механизмов формирования этих заболеваний.

Наиболее универсальным и эффективным методом борьбы с большинством факторов риска развития МС является снижение массы тела при ее избытке. Эффективность возрастает при сочетании рационального питания и индивидуально подобранной физической нагрузки.

Включение препарата метформин и немедикаментозной терапии в состав традиционной терапии детей, спустя 6 и 12 месяцев после выписки из стационара, приводило, к снижению в 2 раза частоты повторных заболеваний БА и стабилизацию иммунологических и функциональных показателей, оказался эффективен по отношению всех составляющих МС: снижение массы тела, артериальной гипертензии, дислипидемии и ИР, значительно уменьшился риск каждого компонента. Однако перед традиционным лечением, уменьшение частоты массы тела и дислипидемии в 1-й группе по сравнению со 2-й группой оказалось недостоверным.

Проведенные исследования позволяют сделать вывод о том, что предложенные дифференцированные схемы лечения с использованием препарата метформин и немедикаментозной терапии в комплексе традиционной терапии у детей БА школьного возраста с МС оказывает положительное влияние на клиническое течение заболевания, способствует улучшению иммунологических показателей приводящих к сокращению сроков пребывания больных в стационаре.

Оценка результатов катамнестических наблюдений за детьми в течение года показала уменьшением частоты повторных заболеваний БА и улучшением метаболических показателей, способствующих повышению качества лечения.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бобоев А. Т., Алимова Г. У., Абдуганиева Э. А. // Матер. Республиканской научно-практической конференции с международным участием «Непрерывное образование медицине: вчера, сегодня, завтра», Ташкент., 2012, С. 222-223.
2. Зиядуллаев Ш. Х. // Проблемы биологии и медицины, Самарканд, 2011, № 3 (66), – С. 56-58.
3. Kawaguchi M., Adachi M., Oda N. // J. Allergy Clin. Immunol., 2004; 114: 1265-1276.
4. Rio-Navarro B. // Allergol. Immunopathol. – 2000. – Vol. 28, № 1. – P. 5–11.
5. Steinke J. W., Barish L. // Res., 2001; 2: 66-70.

## FEATURES OF THE IMMUNE STATUS IN CHILDREN WITH BRONCHIAL ASTHMA AND METABOLIC SYNDROME

Azizova N. D.

*Republican Specialized Scientific and Practical Medical Center of Pediatrics Ministry of Health of the Republic of Uzbekistan, Tashkent, Uzbekistan*

Particularly studied the immunological status changes in 53 children with asthma and its relationship to other forms of MS on the background of overweight. Studies have shown improvement of immunological parameters in the serum of sick children, and these figures can be considered as the most important factors of pathogenic mechanisms of formation of these diseases. Established, objective performance criteria for non-drug and drug therapy in children with asthma and MS. The proposed differentiated treatment regimens using metformin and non-pharmacological treatment in combination of traditional therapy in children of school age with asthma MS has a positive effect on the clinical course of the disease, improves immunological parameters resulting in a shortened hospital stay.

*Key words:* bronchial asthma, children, metabolic syndrome, immunological parameters.

## ВЛИЯНИЕ ГИПОКСИГИПОБАРОТЕРАПИИ НА КЛИНИКО-ИММУНОЛОГИЧЕСКУЮ ЭФФЕКТИВНОСТЬ И ДИНАМИКУ ГОРМОНОВ ГИПОФИЗАРНО-ТИРЕОИДНОЙ СИСТЕМЫ У ДЕТЕЙ С АТОПИЧЕСКИМ ДЕРМАТИТОМ

Алеманова Г. Д.<sup>1</sup>, Попова Л. Ю.<sup>1</sup>, Бегун Д. Н.<sup>1</sup>, Амантурлиева М. Е.<sup>1</sup>,  
Погребнова Е. И.<sup>2</sup>, Анисимова Т. М.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ГБОУ ВПО «Оренбургский государственный медицинский университет»;  
<sup>2</sup>ГАУЗ ООКБ № 2 Областной детский центр аллергологии и клинической иммунологии,  
Оренбург, Россия

В работе представлены данные об эффективности лечения гипоксигипобаротерапией (ГГБТ) детей с атопическим дерматитом. Клинический эффект ГГБТ проявлялся снижением индекса «SCORAD» с формированием клинической ремиссии у 75% больных. Положительная иммунологическая динамика характеризовалась снижением уровня IL-4, общего IgE и, напротив, повышением содержания IL-10 через 3 месяца после ГГБТ по сравнению с данными до лечения. Повышение уровня Т3 в пределах возрастной нормы способствует включению адаптационно-компенсаторных реакций тиреоидной системы.

*Ключевые слова:* атопический дерматит, цитокины, гипоксигипобаротерапия, тиреоидные гормоны.

Атопический дерматит (АД) занимает одно из ведущих мест в структуре аллергических заболеваний [1]. Не утратило своей значимости изучение различных звеньев патогенеза

АД, в том числе и иммунных механизмов его формирования. Тиреоидные гормоны, обладая чрезвычайно широким спектром действия, контролируют состояние практически всех органов и тканей и могут изменяться и при не тиреоидных заболеваниях [2]. Существенные проблемы в терапии АД у детей определяют актуальность применения немедикаментозных методов лечения на этапе реабилитации, в частности гипоксигипобаротерапии (ГГБТ). При этом сведения об изменении цитокинового и тиреоидного статуса у детей с АД при применении ГГБТ весьма ограничены.

**Цель исследования.** Оценить влияние ГГБТ на клинко-иммунологическую эффективность и динамику тиреоидных гормонов у детей, страдающих АД средней степени тяжести в периоде ремиссии.

**Материалы и методы.** Обследованы 28 детей в возрасте от 6 до 13 лет: 18 девочек (64%) и 10 мальчиков (36%) с распространенной формой АД средней степени тяжести, которые получили курс ГГБТ в условиях гипобарической барокамеры «Урал-1». Длительность лечения составила 24 сеанса продолжительностью 3 часа. Во время проведения ГГБТ пациенты не получали медикаментозного лечения. Оценку тяжести клинических проявлений проводили на основании оценки индекса «SCORAD» в период обострения АД. Для оценки эффективности лечения в год предшествующий курсу лечения в барокамере и в последующий за ним сравнивались клинические признаки АД (динамика индекса «SCORAD») и длительность ремиссии. Группу контроля составили 10 условно здоровых детей того же возраста.

Уровень ИЛ-4, ИЛ-10, общего IgE и концентрацию тиреотропного гормона (ТТГ), трийодтиронина (Т3) и тироксина (Т4) в сыворотке крови определяли методом ИФА с использованием коммерческих тест систем «Протеиновый контур» и «АлкорБио» до и через 3 месяца после лечения в барокамере. Статистическая обработка данных проводилась в программе Statistica 10.0. Исследованные параметры имели распределение отличное от нормального, поэтому описывались при помощи медианы и интерквартильного размаха. Для сравнения количественных переменных в зависимых группах использовался непараметрический дисперсионный анализ. Пороговый уровень статистической значи-

мости различий при сравнении переменных принят при  $p < 0,05$ .

**Результаты исследования и обсуждение.** Наследственная отягощенность по АД выявлялась у 43% ( $n=12$ ) детей. На раннем искусственном вскармливании находились 46% ( $n=13$ ) детей. Продолжительность заболевания до 5 лет отмечалась у 18% ( $n=5$ ) больных. В период обострения АД у пациентов преобладали лихеноидные (35,7%) и эритематозно – сквамозные (28,6%) формы заболевания. Рецидивы обострения АД отмечались преимущественно в осеннее – зимний период (82%). В структуре сопутствующей патологии у 25% ( $n=7$ ) больных диагностировался хронический гастрит. Динамика значений индекса «SCORAD» через 3 месяца и 1 год после ГГБТ составила 19 (12-24) и 6 (2-7) баллов соответственно по сравнению с периодом обострения заболевания – 34 (27-38) балла,  $p < 0,001$ . Ремиссия в течение года отмечалась у 75% пациентов. До проведения ГГБТ у больных сохранялся повышенный уровень ИЛ-4, ИЛ-10 и общего IgE в сыворотке крови по сравнению с нормой. Развитие IgE-опосредуемых аллергических реакций в условиях хронизации аллергического воспаления при АД, сопровождается изменением соотношения Th1 и Th2- клеток с повышением активности Th2-клеток (увеличение продукции ИЛ-4). Взаимодействие Т-хелперных лимфоцитов с В-лимфоцитами и связанная с ним активация синтеза ИЛ-4 способствует переключению с синтеза IgM на синтез IgE. Положительная иммунологическая динамика проявлялась достоверным ( $p < 0,001$ ) снижением уровня ИЛ-4 через 3 месяца после ГГБТ (37 (30-45) пг/мл) по сравнению с данными до лечения (53,0 (39,1-63,8) пг/мл) и, напротив, повышением ( $p < 0,05$ ) содержания противовоспалительного цитокина ИЛ-10 (30,6 (30,6-34,3) и 24,9 (13,9-29,4) пг/мл соответственно). Уровень общего IgE достоверно снизился сразу после ГГБТ с 249 (30-727) до 61 (23-98) МЕ/л ( $p < 0,05$ ). Полученный иммунологический эффект ГГБТ отражает поляризацию цитокинов в сторону Th1 профиля.

Клиническое и УЗИ исследование не выявили патологии щитовидной железы у данной группы больных. До курса ГГБТ у детей при средней степени тяжести АД в периоде ремиссии уровень ТТГ, Т3 и Т4 в сыворотке крови находился в пределах нормативного интервала. После ГГБТ и через 3 месяца содержание Т3

повысилось в пределах нормативного значения (2,1 (1,7–3,4) и 2,5 (2,1–2,2) нмоль/л ( $p < 0,05$ ) соответственно) по сравнению с его уровнем до баролечения 1,7 (1,5–1,9) нмоль/л, что может свидетельствовать о включении адаптационно – компенсаторных реакций тиреоидной системы. Краткосрочные и длительные эффекты йодтиронинов синергичны с катехоламинами. Адаптация к умеренной высотной гипоксии характеризуется увеличением запасов катехоламинов надпочечников, через взаимодействие с которыми осуществляются основные физиологические эффекты ТГ [3].

Таким образом, проведенными исследованиями установлено, что ГГБТ в период ремиссии АД приводит к выраженному клиническому эффекту, который проявляется существенным удлинением ремиссии у 75% больных и снижением значения индекса «SCORAD» через 3 месяца и один год после баролечения. Иммунологические эффекты ГГБТ проявляются снижением уровня ИЛ-4, общего IgE и, напротив, повышением уровня

ИЛ-10 через 3 месяца после баролечения (длительный структурный след адаптации). ГГБТ способствует повышению адаптационно – компенсаторных реакций тиреоидной системы, что выражается в повышении концентрации Т3 после ГГБТ и через 3 месяца в пределах нормативного значения.

Полученные данные расширяют терапевтические возможности ГГБТ и свидетельствуют о целесообразности ее включения в программу реабилитационных мероприятий у больных с АД, что имеет высокое практическое значение.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ульянова Л. В., Крошина Л. Ю., Леднева В. С. Вестник новых медицинских технологий 2010, 4, 36-39.
2. Кулинский В. И., Колесниченко Л. С. Биомедицинская химия 2006, 5, 425-447.
3. Фролов Б. А. Гипоксия. Учебное пособие. ОрГМА, Оренбург 2012, 135.

### INFLUENCE OF THE HYPOXIHYPBAROTHERAPY ON THE CLINICAL IMMUNOLOGICAL EFFICIENCY AND THE DYNAMICS OF HORMONES OF THE PITUITARY THYREOID AMONG THE CHILDREN WITH THE ATOPIC DERMATITIS

Alemanova G.D.<sup>1</sup>, Popova L.Y.<sup>1</sup>, Begun D.N.<sup>1</sup>, Amanturlieva M.E.<sup>1</sup>, Pogrebnova E.I.<sup>2</sup>, Anisimova T.M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Orenburg State Medical University; <sup>2</sup>Regional Children's Center of Allergy and Clinical Immunology, Orenburg, Russia

The paper presents the data about the effect hypoxihypobarotherapy (HHBT) in atopic dermatitis children. The pronounced clinical effect of the HHBT was evident in the downward change in the index «SCORAD» together with the formation of the clinical remission among the 75% of patients. The positive immunological dynamics was characterized by the decrease of such levels as IL-4 and the total IgE and, on the contrary, by the increase of the level of IL-10 three months after the HHBT in comparison with the data received before the treatment. The increase of the level of T3 within the expected range for age promotes the activating of the adaptational-compensatory reactions of the thyroid system.

*Keywords:* atopic dermatitis, cytokines, hypoxihypobarotherapy, thyroid hormone.

## КЛИНИКО-МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ И ИММУНОЛОГИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ ВЕНТИЛЯТОР- АССОЦИИРОВАННЫХ ПНЕВМОНИЙ У НОВОРОЖДЕННЫХ

Алиева А. И.<sup>2</sup>, Свитич О. А.<sup>1</sup>, Омарова С. М.<sup>2</sup>,  
Касумова А. М.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ФГБНУ НИИ ВС им. И. И. Мечникова, Москва; <sup>2</sup>Дагестанская Государственная  
Медицинская Академия, Махачкала, Россия

В результате исследования показано, что этиологическая структура ВАП у новорожденных представлена широким спектром микроорганизмов: *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, кокковой флорой и др. У пациентов выявлено иммунодефицитное состояние связанное со сниженной экспрессией генов TLR2 и TLR4.

**Ключевые слова:** новорожденные, вентилятор-ассоциированные пневмонии, микроорганизмы, иммунодефицит, врожденный иммунитет, TLR.

В структуре причин перинатальной смертности в России, по данным Росстата, преобладают внутриутробная гипоксия и асфиксия при рождении – 51,6%, врожденные аномалии – 12,8% и респираторные нарушения – 11,8%. В то же время среди причин смерти детей первой недели жизни доминируют респираторные расстройства, которые составляют 32,3% [2].

Частота вентилятор-ассоциированных пневмоний (ВАП) у новорожденных колеблется в пределах от 37,6% до 58%; летальность достигает 10% [3, 4].

Исследование показателей местного иммунитета дыхательных путей во время проведения «агрессивной» респираторной терапии в условиях колонизации нозокомиальной микрофлорой является актуальным и перспективным направлением современной иммунологии и педиатрии [1, 5].

**Цель исследования** – определить характер микробного биоценоза респираторного тракта и факторов врожденного иммунитета у новорожденных.

**Материалы и методы.** Исследования были проведены в ОРИТ родильного дома РКБ г. Махачкала с 2012 по 2014 гг. При проведении бактериологического исследования клинического материала (кровь, трахеобронхиальный аспират) от новорожденных детей (173) с подозрением на пневмонию было изучено 936 клиниче-

ских образца, выделено и идентифицировано до вида (рода) 587 штаммов микроорганизмов. Все выделенные и идентифицированные культуры протестированы на чувствительность к антибактериальным препаратам (МУК 4.2.1890-04). Для исследования экспрессии генов врожденного иммунитета TLR2, TLR4, HBD-1, HBD-2, TNF $\alpha$  и NF $\kappa$ B из клинического материала проводили выделение РНК с использованием набора «РИБОсорб» (ИЛС, РФ). Проводили ОТ-реакцию с использованием набора «ОТ-1» (Синтол, РФ). Для приготовления ПЦР-смеси в реакциях использовали HotStartTaq DNA Polymerase (Синтол, РФ). ПЦР проводили в амплификаторе для ПЦР-РВ ДТ-96 (ДНК-технология, РФ). Определение уровня экспрессии генов проводилось относительно экспрессии гена  $\beta$ -актина.

**Результаты.** У большинства новорожденных были выделены грамотрицательные микроорганизмы (93%), среди которых преобладали энтеробактерии (79%).

Пневмония, обусловленная *K. pneumoniae* (33%), у большинства новорожденных имела острое течение. При ВАП, вызванных *Ps. aeruginosa* (22%), чаще, чем при других, отмечался геморрагический синдром (у 10 из 35 детей). Пневмония, возбудителем которой являлась *E. coli* (24%), протекала с выраженными проявлениями инфекционного токсикоза чаще, чем в других группах детей. При



ВАП, вызванных *S. epidermidis* (26%), более чем у двух третей детей наблюдались тяжелые формы и острое течение (у 12 из 15 детей). Летальность в этой группе составила 20% (умерло 3 детей). Результаты исследования на внутриутробное инфицирование свидетельствуют о превалировании грамположительных возбудителей в клиническом материале от новорожденных с ВАП над грамотрицательными бактериями и грибами рода *Candida*.

С целью определения тактики этиотропной антибактериальной терапии, был проанализирован уровень резистентности к антибактериальным препаратам – 103 микроорганизмов.

Выделенные штаммы *K. pneumoniae* проявляли резистентность к большинству антибиотиков и сохраняли 100% чувствительность к имипенему и меропенему. Высокую резистентность к антибиотикам также проявляли штаммы некоторых видов энтеробактерии. Большинство штаммов *S. epidermidis* проявляли резистентность к 14 из 20 исследуемых антибиотиков, сохраняя чувствительность к рифампицину, ванкомицину, линкомицину и амоксициллину.

Показатели врожденного иммунитета – Toll-подобные рецепторы (TLR2, TLR4) экспрессировались как на эпителиальных клетках верхних дыхательных путей, так у новорожденных с ВП, так и у детей с ВАП. У новорожденных с ВП уровни экспрессии распознающих структур были достоверно снижены в два раза. Экспрессия гена TLR2 снижалась в 6,2 раза у пациентов с *Klebsiella pneumoniae* и в два и более раз при смешанной инфекции. Уровни экспрессии гена TLR4 были снижены более чем в три раза при инфекции, вызванной *Escherichia coli*.

На следующем этапе были определены уровни экспрессии генов HBD-1 и HBD-2 в эпителиальных клетках верхних дыхательных путей у новорожденных. Экспрессия гена HBD-2 увеличивается в 2,3 раза у детей, у которых определялся инфекционный возбудитель, но при этом отсутствовали клинические проявления пневмонии. Помимо дефензинов, был проведен анализ экспрессии генов провоспалительного цитокина TNF $\alpha$  и фактора транскрипции NF $\kappa$ B в эпителиальных клетках верхних дыхательных путей в исследуемых группах. У детей, у которых выявляли инфекционные возбудители, но не было клинических проявлений, показатель цитокина возрастал более чем в два раза. В группах с внутриутробным инфицированием, с пневмонией новорожденных, вызванной *E. coli*, *Ps. aeruginosa*, кокками и при смешанной инфекции показатель TNF $\alpha$  возрастал в 3-4 раза относительно показателя в группе сравнения. Уровень экспрессии гена NF $\kappa$ B достоверно увеличивался только в группах пациентов с внутриутробным инфицированием плода (в 2,5 раза) и у новорожденных с пневмонией, вызванной кокковой микрофлорой (в 3,1 раз).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Актуальные проблемы неонатологии / под ред. Н. Н. Володина. – М.: ГЭОТАР-МЕД, 2004. 448 с.
2. Геппе Н. А., Волков И. К. // Пульмонология. 2007. – № 4. – С. 56.
3. Литвицкий П. Ф., Синельникова Т. Г. // Вопросы современной педиатрии. 2009. – Т. 8, № 3. – С. 55-65.
4. Мархулия Х. М., Кушнарева М. В., Дементьева Г. М. и др. // Педиатрия. 2005. – № 3. – С. 36-39.
5. Aly H., Badawy M., El-Kholy A. et al. // Pediatrics. 2008. – Vol. 122, N 4. – P. 770-774.

### CLINICAL–MICROBIOLOGICAL AND IMMUNOLOGICAL SUBSTANTIATION OF VENTILATOR-ASSOCIATED PNEUMONIA OF NEONATES

Alieva A. I.<sup>1</sup>, Svitich O. A.<sup>1</sup>, Omarova S. M.<sup>2</sup>, Kasumova A. M.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>FGBU «NII VS im. I. I. Mechnikov» RAMN, Moscow; <sup>2</sup>Dagestan State Medical Academy, Makhachkala, Russia

The study shows that the etiological structure of VAP in neonates presents a wide range of microorganisms: *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* and other. Patients have immune-deficient conditions associated with decreased TLR2 and TLR4 gene expression.

**Key words:** newborn, ventilator-associated pneumonia, bacteria, immune deficiency, innate immunity, TLR.

## ЗАВИСИМОСТЬ ВЛИЯНИЯ БЕТА-ЭНДОРФИНА НА СЕКРЕЦИЮ IL-2, IL-4, IFN- $\gamma$ СПЛЕНОЦИТАМИ МЫШИ ОТ ФАКТОРА ВРЕМЕНИ

Баева Т.А.<sup>1</sup>, Небогатиков В.О.<sup>2</sup>, Тендрякова С.П.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Институт экологии и генетики микроорганизмов Уро РАН; <sup>2</sup>Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

Исследовано влияние бета-эндорфина в зависимости от срока его введения экспериментальным животным на продукцию IL-2, IL-4 и IFN- $\gamma$  спленоцитами мыши. Установлено, что увеличение времени между инъекцией пептида и началом культивированием спленоцитов может играть важную роль в регуляции их секреторной активности, в частности, продукции IL-2 и IL-4.

**Ключевые слова:** бета-эндорфин, цитокины, спленоциты, IL-2, IL-4, IFN- $\gamma$ .

**Актуальность и цель работы.** Бета-эндорфин – нейропептид из группы эндорфинов, который секретируется клетками нервной и иммунной систем и является эндогенным лигандом опиатных рецепторов. Большой практический интерес представляют иммуномодулирующие эффекты бета-эндорфина. Важнейшее значение для реализации его влияния на функции иммунной системы имеют процессы клеточной кооперации, реализуемые за счет цитокиновых взаимодействий. Высокая скорость расщепления  $\beta$ -эндорфина протеазами крови, cerebro-спинальной жидкости и других биологических сред определяет отношение к нему как к молекуле короткодистантного действия, способной оказывать кратковременные биологические эффекты [1, 2]. Еще в 1998 году Sandin J. et al. продемонстрировали, что скорость расщепления  $\beta$ -эндорфина в периферической крови составляет 25 пмоль/мин [1]. Также было установлено, что отщепление пяти С-концевых аминокислотных остатков сопровождается почти полной потерей активности пептида [2]. Тем не менее, наличие в организме сложнейших регуляторных систем дает возможность предполагать существование опосредованных, отсроченных по времени эффектов. Ранее нами было показано, что бета-эндорфин в разных экспериментальных условиях способен оказывать выраженное влияние на продукцию IL-2, IL-4 и IFN- $\gamma$  – цитокинов, играющих важную роль в Th1/Th2 поляризации иммунного ответа [3, 4].

**Цель настоящей работы** – исследовать влияние бета-эндорфина в зависимости от времени введения на продукцию IL-2, IL-4 и IFN- $\gamma$  спленоцитами мыши *in vivo*.

**Материалы и методы.** Эксперимент выполнен на белых беспородных мышах средней массой 25–33 г. Животные содержались в условиях лабораторного вивария, при естественном освещении и свободном доступе к корму и воде.

Бета-эндорфин (Skytek laboratories, США) вводили однократно внутрибрюшинно в объеме 150 мкл. Все животные были разбиты на 2 группы: 1-я – контрольная (физиологический раствор), 2-я –  $\beta$ -эндорфин в концентрации 0,0005 мкг/кг. Одну половину животных выводили из эксперимента спустя 1 час после введения препаратов, другую часть – через 6 часов путем декапитации под эфирным наркозом. Спленоциты выделяли в асептических условиях и культивировали в пластиковых круглодонных 96-луночных планшетах при 37 °С, во влажной атмосфере с 5% содержанием CO<sub>2</sub> в течение 24 или 48 часов. Каждая культура содержала 5\*10<sup>5</sup> клеток в 0,2 мл полной культуральной среды, которую готовили *ex tempore* на основе среды RPMI 1640 («Gibco Live Technology», США). В качестве индуктора цитокиновой секреции использовали конканавалин А (КонА) в концентрации 20 мкг/мл, который вносили непосредственно в культуры.

Концентрацию цитокинов определяли в супернатантах 24-часовых (IL-2) или 48-часовых

(IL-4, IFN- $\gamma$ ) культур методом твердофазного иммуноферментного анализа с помощью наборов Bender Medsystems (Австрия) согласно методике, предложенной производителем.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью однофакторного дисперсионного анализа и апостериорного LSD-критерия Фишера.

**Результаты.** При оценке влияния пептида на продукцию IL-4 наблюдалось усиление Кон А – индуцированной продукции как через 1 ч, так и через 6 ч после инъекции. Следует отметить, что эффект был более выраженным при введении  $\beta$ -эндорфина за 6 часов до начала культивирования. При этом на спонтанную продукцию IL-4 спленocyтaми  $\beta$ -эндорфин влияния не оказывал. В отличие от IL-4, продукция IFN- $\gamma$  статистически значимо не изменялась под воздействием пептида ни в стимулированных, ни в спонтанных культурах, а также не зависела от временного фактора.

Продукция IL-2, индуцированная Кон А, не изменялась под влиянием пептида независимо от времени его инъекции. В то же время на спонтанную продукцию IL-2 зарегистрировано разнонаправленное влияние бета-эндорфина, определяемое сроками его введения. Так, при выделении спленocyтaми через час после инъекции бета-эндорфина, наблюдалось угнетающее влияние пептида на секрецию

IL-2, тогда как через 6 ч после его введения был выявлен стимулирующий эффект на уровень IL-2 в культурах спленocyтaми.

Таким образом, характер влияния бета-эндорфина на продукцию IL-2 и IL-4 мышечными спленocyтaми определяется временем, прошедшим от момента введения пептида до выделения спленocyтaми. Учитывая высокую скорость расщепления бета-эндорфина протеазами биологических жидкостей, отсроченные эффекты, зарегистрированные в данном эксперименте, могут являться результатом подключения иных, центральных механизмов регуляции, активированных опиоидной системой.

Работа поддержана грантом программы Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sandin J., Nylander I., Silberring J. Regulatory Peptides 1998, 73 (1), 67-72.
2. Дмитриев А. Д. Биосинтез нейропептидов. В кн.: Эндорфины. Мир, Москва, 1981, 7-49.
3. Гейн С. В., Баева Т. А., Небогатиков В. О., Тендрякова С. П. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины 2011, 11, 526-529.
4. Гейн С. В., Баева Т. А., Небогатиков В. О. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины 2014, 9, 344-348.

#### THE DEPENDENCE OF BETA ENDORPHIN INFLUENCE ON IL-2, IL-4, IFN- $\gamma$ SECRETION BY MOUSE SPLENOCYTES ON THE TIME FACTOR

Baeva T.A.<sup>1</sup>, Nebogatikov V.O.<sup>2</sup>, Tendryakova S.P.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms UB RAS; <sup>2</sup>Perm state national research university, Perm, Russia

The beta endorphin' influence on IL-2, IL-4 and IFN- $\gamma$  production of a mouse splenocytes depending on the term of its introduction by an experimental animal is investigated. It is established that the increase in time between an peptide injection and the beginning splenocyte's cultivation can play an important role in regulation of their secretory activity, in particular, of production of IL-2 and IL-4.

*Key words:* beta-endorphin, cytokines, splenocytes, IL-2, IL-4, IFN-gamma.

## (СУБ) ПОПУЛЯЦИОННЫЙ СОСТАВ ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У ПАЦИЕНТОВ С ВОЗРАСТНОЙ МАКУЛЯРНОЙ ДЕГЕНЕРАЦИЕЙ

Балацкая Н. В., Еремеева Е. А., Слепова О. С.,  
Куликова И. Г., Сорожкина Е. С.

ФГБУ «МНИИ Глазных болезней им. Гельмгольца» Минздрава России, Москва, Россия

В статье представлены результаты исследования (суб) популяционного состава лимфоцитов периферической крови у пациентов с ранними стадиями возрастной макулярной дегенерации (ВМД) в сравнении со здоровыми лицами пожилого и молодого возраста. Повышение абсолютного и относительного количества  $CD3^+CD8^+$ ,  $CD3^+CD4^+CD8^+$  субпопуляций, В-лимфоцитов, высокая частота их повышенного содержания в крови пациентов с начальной и промежуточной стадиями ВМД и здоровых лиц старшего возраста, позволяют думать о возможной роли сдвигов в содержании данных субпопуляций в патогенезе ВМД.

*Ключевые слова:* лимфоциты, (суб) популяции, возрастная макулярная дегенерация.

**Введение.** Возрастная макулярная дегенерация (ВМД) – хроническое, необратимое, прогрессирующее поражение центрального отдела сетчатки. Доказательства прямой зависимости частоты заболевания от возраста позволяют говорить об инволюционном характере заболевания и рассматривать возраст как серьезный фактор риска [1]. Несмотря на многочисленные исследования, патогенез ВМД во многом не расшифрован. Имеются свидетельства (в основном экспериментальные) о важной роли иммунологических факторов в возникновении и развитии заболевания [2]. Показано, что видоизмененный в процессе старения ретинальный пигментный эпителий (РПЭ) приобретает иммуногенные свойства и становится эпицентром хронического локального воспаления. Прогрессирование заболевания ассоциируется с локальной ишемией клеток пигментного эпителия и активацией РПЭ, накоплением тканеспецифических аутоантител; у большинства больных с ВМД аутоантитела выявляются и в сыворотке крови [3]. Высказано предположение, что одним из иммунологических механизмов, способствующих развитию и прогрессированию ВМД, являются нарушения в (суб) популяционном составе лимфоцитов периферической крови. Однако целенаправленные исследования этого вопроса в эксперименте не проводились, а в клинике единичны [4].

**Цель работы.** Исследование (суб) популяционного состава лимфоцитов у больных ВМД различной степени тяжести в сравнении со здоровыми лицами пожилого (риск ВМД) и молодого возраста

**Материал и методы.** Всего в исследование было включено 47 человек. Первую группу составили 18 здоровых лиц молодого возраста (средний возраст  $27,7 \pm 4,03$  лет; контрольная группа). В остальные группы, сформированные согласно клинической классификации ВМД (AREDS) [5] вошли 29 человек: во вторую группу – 11 практически здоровых доноров пожилого возраста без признаков офтальмопатологии (AREDS1; группа риска ВМД; средний возраст  $57,1 \pm 11,8$  лет), третью группу – 9 пациентов с начальной стадией ВМД (AREDS2; возраст  $53,2 \pm 11,5$  года) и 9 больных с промежуточной стадией ВМД составили 4 группу (AREDS3; средний возраст  $57,1 \pm 11,8$  лет). Материалом исследования служили пробы цельной крови, взятой из локтевой вены натощак в утренние часы (с  $9^{00}$ - $10^{00}$  ч) при помощи вакуумных систем в пробирки Vacuette® с антикоагулянтом К3ЕДТА. Иммунофенотипирование проводили методом лазерной проточной цитофлуориметрии на цитометре BD FACSCanto II (Becton Dickinson, США) с использованием системы моноклональных антител Multitest 6-Color TBNK Reagent в пробирках BD TruCount (Becton Dickinson, США).

Лизис эритроцитов и фиксацию лейкоцитов производили с помощью лизирующего раствора BD FACS™ Lysing Solution (Becton Dickinson, США). Относительное и абсолютное содержание популяций и субпопуляций лимфоцитов определялось в программе Canto (Becton Dickinson, США), с выделением анализируемого региона по общей популяции, экспрессирующей CD45<sup>+</sup> антиген и по гранулярности клеток (CD45<sup>+</sup>PerCP-Cy5,5<sup>+</sup>/SSC); использовались меченые флуорохромами антитела к CD3<sup>+</sup> (FITC), CD4<sup>+</sup> (PE-Cy7\*), CD8<sup>+</sup> (APC-Cy7\*), CD16<sup>+</sup>/56<sup>+</sup> (PE), CD19<sup>+</sup> (APC\*), позволяющие дифференцировать клетки: Т-лимфоциты (CD3<sup>+</sup>), Т-хелперы (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>), Т-цитотоксические (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>), Т-дубль позитивные (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>), NK-клетки – натуральные киллеры (CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>), В-лимфоциты (CD19<sup>+</sup>), вычислить соотношение субпопуляций CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> – иммунорегуляторный индекс (ИРИ), отражающий баланс Т-хелперов и цитотоксических Т-клеток (CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>).

Статистическая обработка данных проведена с помощью программного комплекса Professional BioStat для Windows Version 2009 (t - критерий Стьюдента, критерии Фишера и  $\chi^2$ ), уровень статистической значимости:  $p < 0,05$ .

**Результаты исследования.** Сравнение результатов исследования двух групп людей без явных признаков офтальмопатологии выявило тенденцию к снижению абсолютного числа лимфоцитов (CD45<sup>+</sup>) и общей популяции Т-клеток (CD3<sup>+</sup>) ( $1,16 \pm 0,29 \times 10^9/\text{л}$ ) в старшей возрастной группе (риск ВМД; AREDS1) по сравнению с молодыми людьми. Характерной особенностью группы здоровых лиц пожилого возраста явилось статистически значимое повышение практически в 2 раза как абсолютного, так и относительного количества Т-«дубль позитивных» CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>-лимфоцитов по сравнению с «молодым» контролем ( $1,28 \pm 0,8 \times 10^9/\text{л}$  и  $0,54 \pm 0,31 \times 10^9/\text{л}$ ;  $p < 0,005$ ). При исследовании (суб) популяционного состава крови пациентов с ВМД было обнаружено, что в обеих клинических группах (AREDS2 и AREDS3) происходило дальнейшее, статистически значимое, повышение содержания (как абсолютного, так и процентного) Т-«дубль позитивных» клеток до  $0,02 \pm 0,002 \times 10^9/\text{л}$  ( $1,17 \pm 0,5\%$ ;  $p < 0,005$ ) и  $0,022 \pm 0,014 \times 10^9/\text{л}$  ( $1,14 \pm 0,67\%$ ;  $p < 0,005$ ). Кроме этого, начальная и промежуточная стадии ВМД характеризовались достоверным ростом количества В-лимфоцитов:

абсолютного и относительного при AREDS2 ( $0,31 \pm 0,18 \times 10^9/\text{л}$ ;  $17,2 \pm 6,8\%$ ) и абсолютного при AREDS3 ( $0,24 \pm 0,05 \times 10^9/\text{л}$ ) по отношению к контрольной группе молодых добровольцев ( $0,19 \pm 0,06 \times 10^9/\text{л}$ ;  $10,57 \pm 3,11\%$ ) и группе здоровых лиц пожилого возраста ( $0,19 \pm 0,05 \times 10^9/\text{л}$ ;  $11,7 \pm 0,6\%$ ;  $p < 0,005$ ). На стадии AREDS3 отмечалась тенденция к повышению процентного содержания Т-цитотоксических (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>) лимфоцитов. Полученные данные были подтверждены результатами индивидуального анализа. Так, для лиц пожилого возраста (группа риска ВМД) в 73% случаев отмечено повышение относительного количества Т-«дубль позитивных» клеток, почти в половине случаев (45%) – снижение (суб) популяции CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, и, как следствие последнего, повышение иммунорегуляторного индекса CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> (в 64% случаев). Начальные изменения при AREDS2 характеризовались дальнейшим достоверным увеличением частоты случаев повышения процентного содержания CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> лимфоцитов (89%); в 56% случаев отмечался рост субпопуляции цитотоксических клеток. Практически у половины пациентов этой группы отмечен рост относительного количества В-лимфоцитов. На промежуточной стадии (AREDS3) аналогичные сдвиги в (суб) популяционном составе лимфоцитов были выявлены уже в гораздо большем числе случаев: CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> клетки и В-лимфоциты в 67% и (суб) популяция Т-«дубль позитивных» клеток – в 78% случаев. Следует отметить, что (суб) популяцию CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, а в последнее время и Т-«дубль позитивных» клеток принято рассматривать в аспекте защиты от инфекций. В нашем случае увеличение частоты случаев повышения этих (суб) популяций в крови, отмеченных при начальной (AREDS2) и промежуточной стадиях ВМД (AREDS3) может служить определенным свидетельством влияния инфекционного фактора. Это согласуется с полученными нами данными и мнением ряда исследователей о возможной роли хламидий и вирусов группы герпеса как факторов, способствующих прогрессированию ВМД на фоне ослабления иммунитета.

**Выводы.** Показано, что пожилой возраст, начальная и промежуточная стадии ВМД ассоциируются с более или менее выраженными сдвигами в (суб) популяционном составе лимфоцитов крови по сравнению с контролем – здоровыми лицами

молодого возраста («нормой»). Повышение абсолютного и относительного количества CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> субпопуляций, а также В-лимфоцитов и высокая частота их повышенного содержания в крови пациентов с начальной и промежуточной стадиями ВМД и здоровых лиц старшего возраста, позволяют думать о возможной роли сдвигов в содержании данных субпопуляций в патогенезе ВМД. Полученные данные представляются важными для расшифровки предпосылок развития, критериев прогнозирования, разработки дифференцированного подхода к лечению ВМД.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bunce C., Wormald R. // Eye.-2008.- Vol.22.- P. 905-911.
2. Панова И.Е., Тонких Н.А., Прокопьева М.Ю., Бухтиярова Н.В. // Вестник ОГУ.- 2004 г.- Специальный выпуск.- С.246-248.
3. Слепова О.С. // Офтальмоиммунология: итоги и перспективы.- Материалы конференции 22-23 ноября 2007 г., Москва - С. 255-259.
4. И.Г. Куликова, О.С. Слепова, Е.А. Миронкова, П.В. Макаров, А.Э. Кугушева, Л.А. Ковалева // Российский офтальмологический журнал.- 2013.- Т. 6.- № 4.- С.71-75.5.
5. Age-Related Eye Disease Study Research Group. // Arch. Ophthalmol.- 2001.- Vol. 119 - P.1417-1436.

**PERIPHERAL BLOOD SUBPOPULATION OF LYMPHOCYTES  
OF PATIENTS WITH AGE-RELATED MACULAR DEGENERATION**

**Balatskaya N. V., Ereemeeva E. A., Slepova O. S.,  
Kulikova I. G., Sorozhkina E. S.**

*Moscow Helmholtz Research Institute of Eye Diseases, Moscow, Russia*

The article presents the results of the research peripheral blood lymphocytes (sub) population in the of patients with early stages with age-related macular degeneration in comparison with healthy elderly and young adults. The increase in the absolute and percent amount of CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> subpopulations and B-lymphocytes, the high frequency of their high content in the blood of patients with early and intermediate stages of AMD and healthy older people, suggests a possible role of changes in the content of these subpopulations in the pathogenesis of AMD.

**ВЛИЯНИЕ ВИРУСНЫХ АССОЦИАЦИЙ  
И ХЕЛИКОБАКТЕРНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ НА  
ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ КЛЕТОК КРОВИ**

**Беляев Д. Л.<sup>1</sup>, Бабаянц А. А.<sup>1</sup>, Долгина Е. Н.<sup>2</sup>,  
Фролова И. С.<sup>1</sup>, Антоненко С. М.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России; <sup>2</sup>Институт аллергологии и клинической иммунологии, Москва, Россия

В 80–85% хронические моно и микст инфекции, вирусы группы герпеса 1-6 типов в сочетании с эндотоксинами Н.р. и других Gr<sup>-</sup> бактерий сопровождаются значительным угнетением в 2-4 раза индуцированной продукции клетками крови интерферонов-α и -γ. Отдельные сочетания хронических вирусных инфекций и бактериальных антигенемий могут частично стимулировать продукцию интерферонов, что необходимо учитывать при обследовании, лечении и иммунокоррекции.

*Ключевые слова:* вирусы герпеса, *Helicobacter pylori*, интерфероны-α и -γ.

Поскольку более половины человечества (3,6 млрд.) инфицированы различными штаммами *Helicobacter pylori* (Н.р.) с поражением желудка и 12-и перстной кишки с развити-

ем функциональной диспепсии, хронических воспалительных изменений слизистых оболочек, а 85–95% взрослого населения пожизненно инфицированы вирусами группы герпеса, сочетания этих инфекционных заболеваний представляют наибольший интерес для исследований микст-инфекций и выбора оптимальных схем обследования, мониторинга и лечения. При смешанных инфекциях микробно-вирусной этиологии существенно изменяется функциональная активность клеток крови, определяемая по индуцированной продукции интерферонов- $\alpha$ , - $\gamma$  (ИФ- $\alpha$ , ИФ- $\gamma$ ) и других цитокинов [1–4].

**Цель работы.** Изучение роли вирусов группы герпеса (1, 4, 5 и 6 типов) и их ассоциаций при микст-инфекциях в сочетании с Н.р. хронической инфекцией и антигенемиями других Гр<sup>-</sup> бактерий в формировании вторичных иммунодефицитов.

**Материалы и методы.** Под наблюдением было 315 больных (б-х) с различными проявлениями герпетических и папилломавирусных инфекций, функциональной диспепсии, хронических гастритов, цистита и частых респираторных заболеваний. Антитела (АТ) и антигены (АГ) вирусов группы герпеса (ВГГ) определяли с помощью наборов фирмы Вектор-Бест, Новосибирск. АГ и АТ четырех видов микоплазм и уреоплазмы уреалитикум, а также АГ кишечных инфекций определяли методом непрямых реакций агглютинации [3]. Определение активности ИФ- $\alpha$  и - $\gamma$  проводили методом биологического титрования на культуре клеток [2–4].

**Результаты.** 315 образцов крови, содержащие большое количество АТ к ВГГ (в 2–18 раз выше диагностических титров (д.т.) были разделены на группы: I – в 160 были обнаружены АТ к Н.р. и 69 из них содержали АГ Н.р. и АТ к его АГ в высоких титрах, 68 образцов содержали только АТ к Н.р. в титрах выше д.т. (д.т.=30 ИФЕ) и в 25 образцах титры АТ были ниже д.т. (12±2,4 ИФЕ) но в 9 случаях (36%) в них присутствовали АГ Н.р.; во II в клетках крови у 170 б-х присутствовали АГ ВГГ: в 93 – АГ одного вируса, а в 77 АГ 2, 3 или 4-х вирусов; в III группе были обнаружены АГ других Гр<sup>-</sup> бактерий (шигелл, сальмонелл, иерсиний всего 51) и 39 из них не содержали АГ Н.р.; в IV группе кроме высоких титров АТ к ВГГ АГ вирусов и АГ бактерий не было. Часть образцов I, II и III групп содержала АГ нескольких

бактерий и/или вирусов и бактерий. У б-х с латентными герпетическими моно-инфекциями (ВПГ1, ВЭБ-4т, ЦМВ-5т, ВГ6т) ИФ- $\alpha$  была снижена по сравнению с показателями у доноров (247±14,8 n=46, 256,8±17,9 n=19, 247,5±29,3 n=16, 206,7±27,7 n=12, 330,6±9,6 ед/мл n=60, p<0,001). Для микст-инфекций была получена аналогичная закономерность (194,7±17,3 n=38, 221,8±18,2 n=37, 254,7±27,4 n=20, 213,9±23,3 n=24 p<0,002). Наибольшей активностью по продукции ИФ- $\gamma$  обладали клетки б-х с ЦМВ микст-инфекцией (20,6±2,5 n=20), а наименьший – с ВГ6 (15,3±1,3 n=24, p<0,05). Ассоциации с ЦМВ и ВЭБ способствовали частичному росту ИФ- $\gamma$ , а ВГ6 и ВПГ1 угнетали продукцию при всех сочетаниях микст-инфекций, (23,1±3, n=9 и 12,3±1,2 n=11, p<0,003) и во всех группах отмечалось достоверное снижение продукции ИФ- $\gamma$  по отношению к норме (20,6±2,49 n=20, 18,5±1,5 n=37, 15,3±1,3 n=24, 32,93±0,97 ед/мл n=60, p<0,001). В группах с АГ Н.р. в крови как с АГ вирусов (n=35) так и без них (n=28) ИФ- $\alpha$  и - $\gamma$  практически не различались между собой но были снижены по отношению к норме (ИФ- $\alpha$  250,3±14,5 ИФ- $\gamma$  18,2±1,4 n=35; ИФ- $\alpha$  220±16,1 ИФ- $\gamma$  18,6±1,5 n=28 p<0,001), хотя в подгруппах с отдельными вирусами например с АГ ВПГ1 различия были достоверны и зависели от количества АГ Н.р. (АГ Н.р.++ n=6 ИФ- $\gamma$  28±2,98 и АГ Н.р.+ n=7 ИФ- $\gamma$  16,6±2,6 p<0,02). Показатели ИФ- $\alpha$  и - $\gamma$  в группах с высокими титрами АТ к 2–5 ВГГ и с АГ Гр<sup>-</sup> бактерий включая Н.р. без вирусных АГ тоже не отличались но были достоверно снижены по отношению к показателям у здоровых доноров (n=67 ИФ- $\gamma$  18,3±1,5 и n=70 ИФ- $\gamma$  18,6±1,4, p<0,001). Присутствие бактериальных и вирусных АГ а также их сочетаний разнонаправленно влияло на титры ИФ- $\alpha$  и - $\gamma$ . Так сочетания антигенемии ВГ6 с ВПГ1 вместе с бактериальным эндотоксином сопровождалось более выраженным угнетением ИФ- $\alpha$  и - $\gamma$ , а сочетания с участием ЦМВ меньше подавляли функциональную активность клеток крови. При распределении всех образцов с АГ вирусов и бактерий по активности ИФ- $\gamma$  обнаружено что по уровню ИФ- $\gamma$  от 9,2±0,25 до 17±0,56 и до 31,8±0,4 содержание вирусных АГ снижалось – 126%, 111%, 106%, а содержание бактериальных АГ возрастало – 47%, 57%, 64%. Анализ возрастных характеристик у б-х с моно- и микст-вирусными инфекциями показал, что макси-

мальные изменения ИФ- $\gamma$  были у б-х среднего возраста и зависели от природы вирусов. Если в первой (средний возраст  $23,1 \pm 1,9$ ) и третьей ( $60,3 \pm 1,3$ ) возрастных группах показатели ИФ- $\gamma$  в большинстве случаев мало отличались, то во второй ( $36,5 \pm 1,8$ ) отмечено максимальное снижение ИФ- $\gamma$  у б-х с ВГ6 ( $13,6 \pm 1,6$   $n=10$ ) и минимальное с ЦМВ ( $27,7 \pm 2,2$   $n=12$ ,  $p < 0,001$ ). В группах с ВПГ1 и ВЭБ показатели ИФ- $\gamma$  также были ниже чем в группе с ЦМВ ( $20 \pm 1,7$   $n=30$  и  $27,7 \pm 2,2$   $n=12$   $p < 0,015$  и  $19,2 \pm 1,9$   $n=26$   $p < 0,012$  соответственно), но больше чем с ВГ6 ( $13,6 \pm 1,6$   $n=10$  и  $20 \pm 1,7$   $n=30$   $p < 0,047$  для ВПГ1). При хронических моно- и микстинфекциях с участием ЦМВ (суммарно во всех возрастных группах) отмечено меньшее снижение ИФ- $\gamma$  и по сравнению с ВГ6т  $21,6 \pm 1,7$   $n=32$  и  $16,3 \pm 1,3$   $n=32$   $p < 0,016$  хотя в обеих группах показатели были ниже чем у здоровых лиц по ИФ- $\alpha$  и - $\gamma$  (ЦМВ  $252 \pm 19,8$   $n=32$  и ВГ6  $210,6 \pm 19$   $n=32$  по отношению к норме  $p < 0,001$ ). Для ЦМВ и ВПГ1 значения ИФ- $\gamma$  были больше в средней возрастной группе чем в младшей и старшей ( $16,7 \pm 2,9$   $n=7$  и  $27,7 \pm 2,2$   $n=12$   $p < 0,001$  для ЦМВ и для ВПГ1 чем в младшей  $13,3 \pm 3$   $n=13$  и  $20,4 \pm 1,2$   $n=28$   $p < 0,014$ ). При хронических латентных инфекциях с участием ВГГ в сочетании с хроническими шигеллезами,

сальмонеллезами, иерсиниозами и хеликобактерной инфекцией, определяемой в том числе и только по присутствию АГ или АТ выше д.т. (в динамике), с учетом возможной локализации Н.р. не только в желудочно-кишечном тракте [5], у большинства б-х отмечается выраженный дефицит ИФ- $\alpha$  и - $\gamma$ , причем различные вирусные ассоциации и бактериальные АГ могут оказывать как стимулирующее, так и угнетающее действие на функциональную активность иммунокомпетентных клеток крови, что необходимо учитывать при проведении лечебных мероприятий.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Долгина Е. Н., Беляев Д. Л. Пульмонология, 2006, № 2, с.92-98
2. Беляев Д. Л., Бабаянц А. А., Долгина Е. Н., Фролова И. С., Хатунцева Н. В., Ширин И. Р., Антоненко С. М. Интерферон-2011, М. 2012, с.202-212
3. Беляев Д. Л., Ширин И. Р., Сускова В. С. Вестник Уральской медицинской академической науки, № 2/2, (35), 2011, с.8-9
4. Соловьев В. Д., Бектимиров Т. А. Интерфероны в теории и практике медицины, М. 1981, с.178-201
5. N. A. Melake, G. H. Shaker. Saudi Pharmaceutical Journal (2012) 20, 345-353

## EFFECT OF VIRAL ASSOCIATIONS AND H. PYLORI INTOXICATION ON FUNCTIONAL ACTIVITY OF BLOOD CELLS

Belyaev D. L.<sup>1</sup>, Babayants A. A.<sup>1</sup>, Dolgina E. N.<sup>2</sup>,  
Frolova I. S.<sup>1</sup>, Antonenko S. M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>"N.F. Gamaleya FRCEM"; <sup>2</sup>Institute of Allergology and Clinical Immunology, Moscow, Russia

In 80–85% chronic latent mono and mixed infections caused by viruses of the herpes group are accompanied by significant inhibition of induced production of interferon- $\alpha$  and - $\gamma$  by blood cells in 2-4 times, and association with bacterial antigen burden this oppression. Certain combinations of chronic viral infections and bacterial antigenemia may partly stimulate the production of interferons. The wide spreading of these chronic infections necessitates a comprehensive survey of patients in case of detecting at least one of the listed diseases, and the definition of interferon- $\alpha$  and - $\gamma$  production especially in young and old age may enhance the effectiveness of pathogenetic and etiotropic treatment.

*Key words:* herpes viruses, *Helicobacter pylori*, interferons- $\alpha$  и - $\gamma$ .



## ИССЛЕДОВАНИЕ ФЕНОТИПИЧЕСКОГО СОСТАВА ЛИМФОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ РАСПРОСТРАНЕННЫМ ГНОЙНЫМ ПЕРИТОНИТОМ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СТЕПЕНИ ТЯЖЕСТИ

Беленюк В. Д.<sup>1</sup>, Мошев А. В.<sup>1</sup>, Кашникова Е. С.<sup>1</sup>,  
Савченко А. А.<sup>1</sup>, Борисов А. Г.<sup>1</sup>, Черданцев Д. В.<sup>2</sup>,  
Первова О. В.<sup>2</sup>, Шапкина В. А.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ФГБНУ «Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера»; <sup>2</sup>ГБОУ ВПО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого», Красноярск, Россия

Гнойный перитонит является одной из самых серьезных проблем в современной абдоминальной хирургии. В целях обеспечения всестороннего подхода к данной проблеме нами были проанализированы количественные и качественные изменения, коснувшиеся состояния Т-киллеров, Т-хелперов и регуляторных Т-лимфоцитов, а так же В-клеток памяти и наивных В-лимфоцитов. В ходе исследования были обнаружены количественные и качественные изменения фенотипического состава лимфоцитов. Было зафиксировано увеличение количества иммунокомпетентных клеток, активно задействованных в процессах борьбы с воспалением. В то же время в отдельных группах наблюдалось угнетение активационных процессов, связанных с системой иммунитета.

*Ключевые слова:* перитонит, лимфоциты, проточная цитометрия.

Распространенный гнойный перитонит (РГП), несмотря на достижения современной медицины в области абдоминальной хирургии, по-прежнему остается одним из самых серьезных заболеваний. Летальность при РГП колеблется на уровне от 11 до 40%, а в случае генерализации инфекции и развития полиорганной недостаточности может достигать 80% [2,3]. Тяжесть течения РГП, а так же характер и особенности развития различных осложнений, как правило, определяются не только тяжестью основного патологического процесса и адекватностью проводимого лечения, но и во многом зависит от изменений, происходящих в системе иммунитета [1,3,4]. Важным компонентом этой системы являются лимфоциты, активно вовлекающиеся в процессы борьбы с вирусным и бактериальным заражением [1,4]. Все лимфоциты делятся на В- и Т-клетки. В-лимфоциты (CD19<sup>+</sup>) составляют 10-15% от всех лимфоцитов и играют важную роль в обеспечении гуморального иммунитета. При контакте с антигеном или будучи активированными клетками презентующими антиген, В-лимфоциты трансформируются

в плазматические клетки, способные к продукции антител [1,3,4]. В-клетки подразделяются на В-клетки памяти (CD19<sup>+</sup> CD27<sup>+</sup>), обеспечивающие иммунную память и наивные В-клетки (CD19<sup>+</sup> CD27<sup>-</sup>), готовые к активации и обеспечению противобактериальной защиты. Также В-лимфоциты можно разделить на В2-клетки (CD19<sup>+</sup> CD5<sup>-</sup>), являющиеся основной популяцией В-клеток. И В1-клетки (CD19<sup>+</sup> CD5<sup>+</sup>), минорную популяцию, составляющую около 5% от общей популяции, они локализируются в основном в барьерных тканях [1,4,5]. Т-лимфоциты (CD3<sup>+</sup>) составляют 70-80% от всех лимфоцитов крови и играют важную роль в приобретённом иммунном ответе, обеспечивая распознавание и уничтожение клеток, несущих чужеродные антигены. Они усиливают действие моноцитов, НК-клеток, а также принимают участие в переключении изотипов иммуноглобулинов. Т-лимфоциты подразделяются на Т-хелперы (CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>) и Т-киллеры (CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup>), различающиеся выполняемыми функциями [1,3,5].

Целью данного исследования явилась оценка фенотипического состава лимфоцитов

у больных с распространенным гнойным перитонитом в зависимости от степени тяжести.

**Материалы и методы.** На базе Красноярского краевого гнойно-септического центра Краевой клинической больницы г. Красноярска обследовано 32 пациента с острыми хирургическими заболеваниями и травмами органов брюшной полости, осложнившимися РГП, в возрасте 30-65 лет (средний возраст пациентов составил 46 лет). Из исследования были исключены пациенты, у которых причиной РГП являлись: острый деструктивный панкреатит (панкреонекроз), тотальный мезентериальный тромбоз, онкологические заболевания, туберкулез, беременность. Все пациенты были разделены на группу средних тяжелых ( $n=23$ ) и группу тяжелых пациентов ( $n=9$ ). В качестве контроля на базе Красноярского краевого центра крови № 1, было обследовано 40 относительно здоровых людей аналогичного возрастного диапазона.

Гематологическое исследование проводилось на автоматическом анализаторе «XE-5000» (Sysmex, Япония). Иммунофенотипирование лимфоцитов проводили методом проточной цитометрии с использованием прямой пятицветной иммунофлуоресценции цельной периферической крови с использованием моноклональных антител (BeckmanCoulter, USA), меченных FITC (fluorescein isothiocyanate), PE (phycoerythrin), ECD (phycoerythrin-TexasRed-X), PC5 (phycoerythrin-cyanin 5) и PC7 (phycoerythrin-cyanin 7). Использовали следующие антитела: CD45-FITC, CD4-RD1, CD8-ECD, CD3-PC5, CD19-PE, CD25-PC7, CD127-PE, CD62L-FITC, CD27-PC7, CD5-FITC, CD23-PC7. Пробоподготовку осуществляли по стандартной методике [5]. Лизис эритроцитов проводили по безотмывочной технологии с использованием реагента VerasLyse (Beckman Coulter, США). Анализ окрашенных клеток проводили на проточном цитофлуориметре Cytomics FC-500 (BeckmanCoulter, USA) [5]. В каждой пробе анализировали не менее 50000 лимфоцитов. Все исследования выполнены с информированного согласия испытуемых и в соответствии с этическими нормами Хельсинкской Декларации 2001 г.

Статистический анализ осуществляли в пакете прикладных программ Statistica 8.0 (StatSoft Inc., 2007). Описание выборки производили с помощью подсчета медианы (Me) и интерквартильного размаха в виде 25 и 75 проценти-

лей ( $C_{25}-C_{75}$ ). Достоверность различий между показателями независимых выборок оценивали по непараметрическому критерию Манна-Уитни (Mann-Whitney U test).

**Результаты и обсуждение.** На основании проведенного исследования, у пациентов с РГП, по сравнению с контрольной группой были выявлены количественные и качественные изменения в фенотипическом составе лимфоцитов. Было обнаружено достоверное увеличение содержания общих лейкоцитов при РГП в сравнении с контролем, сохраняющееся в ходе всего лечения.

В группе тяжелых пациентов, несмотря на увеличение количества Т-лимфоцитов, было отмечено уменьшение числа клеток несущих CD25, указывающее на снижении количества активированных Т-лимфоцитов. В группе среднетяжелых пациентов было обнаружено значительное снижение количества цитотоксических Т-клеток ( $p<0,05$ ). Значительно увеличилось количество Т-хелперов ( $p<0,01$ ) и регуляторных Т-клеток ( $p<0,001$ ). Было зафиксировано увеличение количества цитотоксических Т-лимфоцитов экспрессирующих CD62L ( $p<0,001$ ). Это может указывать на активацию процессов миграции клеток в очаги воспаления. В группе тяжелых пациентов было зафиксировано достоверное повышение количества общих Т-лимфоцитов ( $p<0,05$ ). Достоверно увеличилось содержание Т-хелперов ( $p<0,01$ ), в то же время уровень цитотоксических Т-лимфоцитов остался неизменным. Увеличилось количество Т-хелперов экспрессирующих CD62L ( $p<0,001$ ). Также возрос уровень экспрессии самого маркера ( $p<0,01$ ). Это указывает на активацию процессов миграции клеток. При анализе В-клеточного звена иммунитета в первой группе было показано значительное снижение В1-клеток ( $p<0,01$ ), относительно контрольной группы. Остальные популяции В-клеток не подверглись значительным изменениям. В то же время значительно повысилось количество В2-клеток ( $p<0,05$ ) и В-клеток памяти ( $p<0,05$ ) экспрессирующих CD23, что указывает на активацию В-клеточного звена и усиление гуморального иммунитета. Во второй группе, по аналогии с первой, значительному снижению подверглась популяция В1-клеток ( $p<0,01$ ). Также значительно снизилось количество В-клеток, несущих CD23 ( $p<0,01$ ). Значимо снизилась экспрессия CD23, на поверхности всех субпо-

пуляций В-клеток ( $p < 0,01$ ). Подобная картина указывает на снижение уровня активации В-лимфоцитов и, как следствие, торможение гуморального иммунного ответа, первопричиной которого может являться системное истощение ресурсов организма.

**Заключение.** В ходе исследования были обнаружены количественные и качественные изменения фенотипического состава лимфоцитов, указывающие на различную степень активации процессов, протекающих в системе иммунитета, в зависимости от степени тяжести РПП. В группе среднетяжелых пациентов было зафиксировано увеличение количества клеток иммунной системы, активно задействованных в процессах борьбы с воспалением. В то же время отмечалось увеличение эффективности функционирования самих клеток, на что указывает повышение экспрессии активационных маркеров в рамках всех исследуемых

субпопуляций. В группе с тяжелыми пациентами активационные процессы были значительно замедлены, на что указывает снижение экспрессии активационных маркеров на фоне классического алгоритма развития изменений в рамках иммунной системы.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ярилин А. А. Иммунология. ГЭОТАР-Медиа, Москва 2010, 752.
2. Бойко В. В., Криворучко И. А., Тесленко С. Н., Сивожелезов А. В. Распространенный гнойный перитонит. Харьков: Прапор, 2008. 280 с.
3. Беленюк В. Д., Гвоздев И. И., Мошев А. В., Кошечев В. Н. // Вестник ХГУ. 2014. № 8. С. 24-26.
4. Савченко А. А., Борисов А. Г. Основы клинической иммунометаболомики. Новосибирск: Наука, 2012. 263 с.
5. Luidier J. I., Cyfra M., Johnson P., Auer I. Lab. Hematol. 2004, V. 10, P. 102-108.

#### RESEARCH OF STATUS OF LYMPHOCYTES IN PATIENTS WITH PURULENT PERITONITIS IN PREVALENCE DEPENDING ON THE SEVERITY

**Belenyuk V. D.<sup>1</sup>, Moshev A. V.<sup>1</sup>, Kashnikova E. S.<sup>1</sup>, Savchenko A. A.<sup>1</sup>,  
Borisov A. G.<sup>1</sup>, Cherdantsev D. V.<sup>2</sup>, Pervova O. V.<sup>2</sup>, Shapkina V. A.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>FGBNU "Scientific Research Institute of Medical Problems of the North"; <sup>2</sup>IPO Medical University "Krasnoyarsk State Medical University. prof. VF Voyno-Yasensky", Krasnoyarsk, Russia

Purulent peritonitis is one of the most serious problems in modern abdominal surgery. In order to ensure a comprehensive approach to this issue, we have analyzed the quantitative and qualitative changes that are taking the state of killer T-cells, T-helper cells and regulatory T-lymphocytes, as well as memory B cells and naive B cells. The study found qualitative and quantitative changes of phenotypic lymphocytes. Was recorded increase in the number of immune cells, actively involved in the fight against pathogenesis. At the same time in separate groups was observed inhibition of the activation processes associated with the immune system.

*Keywords:* peritonitis, lymphocytes, flow cytometry.

## ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ КЛЕТКИ КРОВИ ПРИ ВИРУСНЫХ МИКСТ-ИНФЕКЦИЯХ С БАКТЕРИАЛЬНЫМИ ЭНДОТОКСИКОЗАМИ

Беляев Д. Л.<sup>1</sup>, Бабаянц А. А.<sup>1</sup>, Долгина Е. Н.<sup>2</sup>,  
Фролова И. С.<sup>1</sup>, Антоненко С. М.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБУ «ФНИЦЭМ им.Н.Ф.Гамалеи» Минздрава России; <sup>2</sup>Институт аллергологии  
и клинической иммунологии, Москва, Россия

Обследовано 295 б-х с хроническими микст-инфекциями микробной (антигенемии Гр<sup>-</sup> бактерий) и герпес вирусной (1–6 типов) этиологии. Продукция интерферонов-α и/или -γ была достоверно снижена у 85% б-х,  $p < 0,001$ . 21 (15%) больной имел нормальные показатели по ИФ-γ и -α при антигенемиях по *Yersinia pseudotuberculosis* (Y.pst), *Shigella sonnei* (S. sonnei) и герпетических микст вирусных инфекциях. Высокие показатели ИФ-α и -γ у части б-х с микст-инфекциями микробной и вирусной этиологии необходимо учитывать при обследовании, терапии и иммунокоррекции.

**Ключевые слова:** вирусы группы герпеса (1,4,5 и 6 типа), *Helicobacter pylori*, антигены Гр<sup>-</sup> бактерий, интерфероны-α и -γ, микст-инфекции.

Снижение популяционного иммунитета, значительное расширение диагностических возможностей по выявлению инфекционных агентов и рост частоты смешанных форм инфекционных процессов диктует необходимость разработки новых схем обследования и оценки роли отдельных возбудителей в формировании тяжелых вторичных иммунодефицитов. Для предварительной оценки степени нарушения цитокиновой регуляции использовали индуцированную продукцию интерферонов клетками крови. Этот тест удобен, экономически целесообразен и за 2–4 дня позволяет оценить уровень вторичных иммунодефицитов, которыми обычно сопровождается течение хронических микст-инфекций.

**Цель работы.** Изучение возможной роли эндотоксикозов вызванных Гр<sup>-</sup> бактериями и вирусных ассоциаций в формировании вторичных иммунодефицитов, ассоциированных с индуцированной продукцией интерферонов-α и -γ (ИФ-α, и ИФ-γ).

**Материалы и методы.** Антигены (АГ) шигелл (*Shigella flexneri* (S.fl.), *Shigella sonnei* (S. sonnei)), сальмонелл (*Salmonella D/E* (Salm.)), иерсиний (*Yersinia pseudotuberculosis* (Y.pst), а также *Helicobacter pylori* (H.p.) определяли в сыворотках крови больных (б-х) после де-

натурации посторонних белков и антител (АТ) методом непрямой реакции агглютинации [1,2]. Исследована индуцированная продукция клетками крови ИФ-α и -γ у 295 б-х с титрами АТ к вирусам группы герпеса (ВГГ) в 2–16 раз выше диагностических титров (д.т.) при хронических микст-инфекциях с антигенемиями (в клетках крови АГ вирусов герпеса 1,4,5 и 6 типа и в сыворотке крови для АГ Гр<sup>-</sup> бактерий). АТ и АГ вирусов группы герпеса определяли с помощью наборов Вектор-Бест (РФ). Индукцию интерферонов и их титрование проводили по стандартной методике описанной ранее [1–3].

**Результаты.** Все образцы сывороток от 295 б-х содержали АТ к 1–5 ВГГ и у 70 (I гр.) были обнаружены АГ ВГГ в клетках крови, у 71 (II гр.) в сыворотках были АГ *H.p.* в двух различных концентрациях (*H.p.*<sup>+</sup> или *H.p.*<sup>++</sup>), в сыворотках III группы (46) содержались АГ других Гр<sup>-</sup> бактерий *Salm.*, *S.fl.*, *S.sonnei*, *Y.pst*. В отсутствие вирусных АГ в подгруппе с низкой концентрацией АГ *H.p.*<sup>+</sup> (n=19, ИФ-α=256,8±16,8 ед/мл и ИФ-γ=20,2±2 ед/мл) индуцированная продукция интерферонов была больше чем при высоких дозах АГ *H.p.*<sup>++</sup> (n=8, ИФ-α=185±31,1 и ИФ-γ=15,5±1,59,  $p < 0,027$  и 0,039). В другой подгруппе при

одновременном обнаружении и вирусных и бактериальных АГ в крови и клетках крови продукция ИФ- $\alpha$  и - $\gamma$  была большей при высокой дозе АГ *H.p.*<sup>++</sup> (268,2 $\pm$ 19 и 21,65 $\pm$ 1,9  $n=17$ ), а с моно вирусной антигемией ещё больше ( $n=7$ , 274,3 $\pm$ 23,8 и 24 $\pm$ 2,47). При сравнении группы с АГ *H.p.*<sup>++</sup> с АГ в клетках крови ВПГ1 (1т) вместе с подгруппой *H.p.*<sup>++</sup> где были АГ вирусов ВПГ1 и ВЭБ (4т) с аналогичной подгруппой но с АГ *H.p.*<sup>+</sup> получены достоверные различия (*H.p.*<sup>++</sup>  $n=11$ , ИФ- $\alpha=301,8\pm 18,2$  и ИФ- $\gamma=24\pm 2,4$  и *H.p.*<sup>+</sup>  $n=13$  ИФ- $\alpha=212,3\pm 26,9$  и ИФ- $\gamma=16,9\pm 2,18$   $p<0,016$  и  $p<0,04$ ). Все микст-инфекции (с 2-3 вирусными АГ) с участием ЦМВ (5т), сальмонелл и шигелл сопровождались максимальной продукцией ИФ- $\alpha=293,3\pm 26,7$  и ИФ- $\gamma=28\pm 2,7$   $n=6$ . В III группе где кроме вирусных АГ были АГ сальмонелл, шигелл и иерсиний влияние на индуцированную продукцию клетками крови ИФ- $\alpha$  и - $\gamma$  не было однозначным. Во всех случаях как при сочетании АГ Гр<sup>-</sup> бактерий (*S. sonnei* и *Y.pst*) с вирусными АГ в клетках крови, так и в образцах без вирусных АГ, индуцированная продукция ИФ- $\alpha$  и - $\gamma$  не была снижена и не отличалась от показателей для здоровых доноров (средний возраст 46 $\pm$ 4,6  $n=8$  ИФ- $\alpha=300\pm 20$ ; ИФ- $\gamma=33\pm 1$ , норма ИФ- $\alpha=330,6\pm 9,6$  и ИФ- $\gamma=32,93\pm 0,97$   $n=60$ ). Для подгрупп с АГ *S.fl* и *Salm.* (с и без содержания вирусных АГ в клетках крови) достоверных различий не было, хотя в случае с АГ *S.fl* тенденция была очевидной, но требует дальнейшего накопления материалов ( $n=8$  15,5 $\pm$ 2,67 и 19,4 $\pm$ 3,75  $n=7$ ). По сравнению с нормой все показатели в группах с АГ *Salm.* и *S.fl* были существенно меньше (*S.fl*  $n=15$ , ИФ- $\alpha=230\pm 18,7$  и ИФ- $\gamma=16,95\pm 2,03$  норма ИФ- $\alpha=330,6\pm 9,6$  и ИФ- $\gamma=32,93\pm 0,97$   $n=60$ ,  $p<0,001$  и  $p<0,001$ ). Значительная часть б-х с жалобами на хроническую усталость, рецидивы герпетических инфекций (ВПГ1, ВПГ2), шейными лимфаденитами, рецидивирующими воспалительными заболеваниями верхних дыхательных путей, циститами, гастритами, функциональной диспепсией и гастроэзофагальной рефлюксной болезнью часто в сочетании с хроническими запорами требуют тщательного обследования на наличие АГ патогенной кишечной флоры, в том числе и в сыворотках больных. Определение АГ патогенных бактерий включая *H.p.* одновременно с активацией хронических герпетических инфекций позво-

ляет более корректно спланировать последовательность лечебных мероприятий, включая иммунокорректирующую терапию, поскольку у таких б-х вторичные иммунодефициты могут носить разноплановый характер [4]. Однако в большинстве случаев необходимо одновременно с проведением антибактериальной терапии компенсировать и недостаточность противовирусного иммунитета которая может усиливаться после комбинированного применения антибиотиков. Определение индуцированной продукции ИФ- $\alpha$  и - $\gamma$  одновременно позволяет составить представление о нарушениях в иммунной системе способствующих формированию хронических микст-инфекций микробно-вирусной этиологии [1, 4]. С другой стороны обнаружение в крови АГ *H.p.* более корректно отвечает на вопрос об истинной эрадикации бактерий *H.p.*, шигелл, сальмонелл и иерсиний из организма поскольку для большинства таких хронических форм описаны возможные варианты персистенции патогенных бактерий в различных органах и тканях (среднее ухо, слизистые оболочки полости рта, конъюнктивы век и др.) [4, 5]. Изучение существенного подавления индуцированной продукции клетками крови ИФ- $\alpha$  и - $\gamma$  и их компенсация в случаях отдельных комбинаций, описанных выше, позволяет принимать адекватные меры для терапии микст-инфекций даже в случаях нормальных или близких к норме значениях при хронических заболеваниях, связанных с персистенцией представителей патогенной кишечной флоры, герпетических микст-инфекций и ряде других вирусов и микробных возбудителей, часто формирующих в организме хронические инфекционные очаги.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Беляев Д. Л., Бабаянц А. А., Долгина Е. Н. и др. Интерферон-2011, Сборник научных статей, М. 2012, с. 202-212
2. Беляев Д. Л., Бабаянц А. А., Хатунцева Н. В., Фролова и др. Вестник Уральской медицинской академической науки, № 4 (41), 2012
3. Соловьев В. Д., Бектимиров Т. А. Интерфероны в теории и практике медицины, М. 1981, с. 178-201
4. Корниенко Е. А., Антонов П. В., Нажиганов О. Н. Детская гастроэнтерология и нутрициология, т. 11, № 13, 2003, с. 782-786
5. Saki N., Zadeh A. R. S., Jonaky R. S. Jundishapur J Microbiol, 2014 March;7 (3): e15694, p. 1-4

## FUNCTIONAL ACTIVITY OF BLOOD CELLS IN VIRAL MIXED INFECTIONS WITH BACTERIAL ENDOTOXICOSIS

Belyaev D. L.<sup>1</sup>, Babayants A. A.<sup>1</sup>, Dolgina E. N.<sup>2</sup>,  
Frolova I. S.<sup>1</sup>, Antonenko S. M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>"N.F. Gamaleya FRCEM"; <sup>2</sup>Institute of Allergology and Clinical Immunology, Moscow, Russia

295 patients with chronic mixed infections of microbial (antigenes Gr<sup>-</sup> bacteria) and viral (herpes group of viruses types 1–6) etiology were examined. Induced production of interferon- $\alpha$  and/or - $\gamma$  was significantly reduced in 85%,  $p < 0,001$ . 21 (15%) Pts had normal levels of IFN- $\gamma$  and - $\alpha$  with antigenemia by *Yersinia pseudotuberculosis* (*Y.pst*), *Shigella sonnei* (*S.sonnei*) and mixed viral infections. High levels of IFN- $\alpha$  and - $\gamma$  in part of the Pts with mixed infections of microbial and viral etiology must be considered when examining, therapy and immunomodulation.

**Key words:** herpes group of viruses (1, 4, 5 and 6 types), *Helicobacter pylori*, antigenes Gr<sup>-</sup> bacteria, interferons- $\alpha$  и - $\gamma$ , mixed infections.

## НЕЙРО-ИММУННО-ЭНДОКРИННАЯ ОСЬ У ЛЮДЕЙ ПОЖИЛОГО ВОЗРАСТА С РАЗНЫМ КАЧЕСТВОМ ЖИЗНИ

Бурмистрова А. А.<sup>1</sup>, Филиппова Ю. Ю.<sup>1</sup>, Михайлова А. С.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ФГБОУ ВПО Челябинский государственный университет; <sup>2</sup>ГСУ СО «Челябинский геронтологический центр», Челябинск, Россия

Исследован профиль цитокинов и уровень гормонов стресса (адренокортикотропного гормона – АКТГ и кортизола) в плазме крови людей пожилого возраста с разным качеством жизни. Не зависимо от качества жизни, у пожилых людей наблюдались достоверно высокие системные уровни цитокинов: IL-6, TNF- $\alpha$  и IL-1 $\beta$ , по сравнению с молодыми индивидуумами. У людей пожилого возраста с высоким качеством жизни (группа «активное долголетие») концентрация цитокина IL-6 была значимо ниже по сравнению с аналогичными показателями людей со средним (группа «промежуточного типа») и низким (группа «милосердие») качеством жизни. В группе людей с низким качеством жизни («милосердие») наблюдается достоверно высокий уровень кортизола в плазме крови на фоне низкой (на уровне группы доноров) концентрации АКТГ.

**Ключевые слова:** пожилые люди, цитокины, адренокортикотропный гормон, кортизол.

Увеличение продолжительности жизни, наблюдаемое в последние десятилетия, ведет к общему старению населения во всем мире. Согласно докладу, опубликованному Фондом Организации Объединенных Наций, число людей старше 60 лет к 2050 году превысит 2 миллиарда человек. Процесс старения сопровождается специфическими физиологическими изменениями нейро-иммунно-эндокринной оси организма человека, что приводит к развитию возраст-ассоциированных заболеваний, среди которых особое место занимает когнитивная дисфункция:

от легкой степени до деменции и болезни Альцгеймера.

К настоящему времени достигнуты значительные успехи в понимании механизмов развития когнитивной недостаточности у пожилых людей, однако вопрос о том, являются ли высокие уровни циркулирующих цитокинов триггером возраст-ассоциированных заболеваний или только отражают сумму текущих патологических процессов, остается открытым.

**Цель:** определить профиль цитокинов: IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-18, IL-10 и уровень гормонов стресса: кортизола, адренокортикотроп-

ного гормона (АКТГ) в плазме крови людей пожилого возраста с разным качеством жизни.

**Материалы и методы.** В исследование были включены 66 человек пожилого возраста, проживающих в «Челябинском геронтологическом центре». Средний возраст обследованных составил  $79 \pm 5$  лет. Качество жизни пожилых людей определяли в ходе ежемесячного мониторинга их физического и когнитивного состояния с помощью индекса Бартела (Barthel Index of Activities of Daily Living, 1993) и в соответствии с классификацией стадий дисциркуляторной энцефалопатии Н.Н. Яхно с соавт. (2003). По результатам оценки качества жизни все обследованные были разделены на 3 группы: 21 человек с высоким качеством жизни (имели незначительные физические нарушения и умеренное когнитивное расстройство) – группа «активное долголетие», 16 человек, с низким качеством жизни (имели существенную физическую слабость и выраженную когнитивную недостаточность, проявляющуюся сосудистой деменцией) – группа «милосердие» и 29 человек со средним качеством жизни (имели либо выраженные физические, либо когнитивные нарушения) – группа «промежуточного типа».

Пожилые люди всех групп имели одинаковые возраст-ассоциированные заболевания: сердечно-сосудистые, бронхолегочные, заболевания желудочно-кишечного тракта и опорно-двигательного аппарата. При этом из исследования были исключены индивидуумы с ожирением, онкологическими заболеваниями, болезнью Паркинсона и Альцгеймера, синдромом Дауна, врожденными нарушениями центральной нервной системы.

Группу сравнения составили случайным образом отобранные 19 штатных доноров крови ОГУП «Челябинская областная станция переливания крови» (группа «доноры»).

Уровень цитокинов: IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-18, IL-10 (ЗАО «Вектор Бест», Новосибирск) и гормонов: кортизола (ООО «Хема», Москва) и адренкортикотропного гормона (АКТГ, «Biomerica», Германия) определяли в плазме крови доноров и пожилых людей методом твердофазного иммуноферментного анализа на анализаторе Multiscan Ex (Labsystems, Финляндия) согласно инструкциям производителей.

В ходе статистической обработки данных использовали порядковые статистики и крите-

рии: для оценки центральной тенденции – расчет медиан и 25-75 квартилей, для оценки значимости межгрупповых различий – критерий Краскела-Уоллиса с апостериорными парными сравнениями по Коноверу-Инману.

**Результаты.** На первом этапе работы мы провели сравнительный анализ показателей уровней цитокинов: IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-18 и IL-10, в плазме крови доноров и пожилых людей с разным качеством жизни. Анализ данных показал, что, независимо от качества жизни, у людей пожилого возраста по сравнению с группой доноров в плазме крови были достоверно повышены уровни IL-6 и TNF- $\alpha$ . Кроме того, в группах пожилых людей «промежуточного типа» и «милосердие» наблюдался достоверно высокий уровень IL-1 $\beta$  по сравнению с группой доноров. В группе «активное долголетие» системный уровень этого цитокина также был выше, чем в контроле, не достигая статистической значимости. Полученные нами данные согласуются с концепцией наличия у пожилых людей системного хронического низкоградуированного воспаления [1]. Однако, нами обнаружено, что пожилые люди с высоким качеством жизни (группа «активное долголетие») имеют статистически значимо более низкие уровни IL-6 по сравнению с группами людей «промежуточного типа» и «милосердие», что может играть протекторную роль, т.к. высокие системные уровни IL-6 являются сильным предиктором развития сердечно-сосудистых заболеваний, сосудистой деменции и смертности у людей пожилого и старческого возраста [1, 3].

Известно, что проявления и выраженность системного воспалительного ответа во многом определяются состоянием нейро-эндокринной системы, прежде всего гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси (ГГН-оси), поэтому на втором этапе работы мы оценили уровни кортизола и адренкортикотропного гормона в плазме крови пожилых людей с разным качеством жизни. Обнаружено, что у людей группы «активное долголетие» и группы «промежуточного типа» в плазме крови наблюдался достоверно высокий уровень АКТГ по сравнению с показателями группы «доноры», а концентрация кортизола оставалась на уровне показателей людей молодого возраста. В группе «милосердие» (люди со значительными нарушениями физического статуса и когнитивной несостоя-

тельностью) картина была прямо противоположной: низкая (на уровне группы доноров) концентрация в плазме АКТГ на фоне достоверно высокого уровня кортизола. Таким образом, у пожилых людей с низким качеством жизни (группа «милосердие») в ответ на физиологические уровни АКТГ вырабатывается избыточное количество кортизола, что может привести к развитию хронического стресса и к повреждению областей мозга, отвечающих за когнитивные функции (префронтальной коры, паравентрикулярных нейронов, гипо-

кампа). Такие повреждения, в свою очередь, могут способствовать развитию депрессии, когнитивных расстройств и болезни Альцгеймера у пожилых людей [2].

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bruunsgaard H. Eur. Cytokine Netw. 2002. 13 (4): 389-391.
2. Gupta D., Morley J.E. Compr. Physiol. 2014. 4 (4): 1495-1510.
3. Ravaglia G., Forti P., Maioli F. et al. Neurobiology of Aging. 2007. 28: 1810-1820.

### SYSTEMIC LOW GRADED INFLAMMATION AND STRESS RESPONSE IN ELDERLY PEOPLE WITH DIFFERENT QUALITY OF LIFE

Burmistrova A. L.<sup>1</sup>, Filippova Yu. Yu.<sup>1</sup>, Mikhailova A. S.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Chelyabinsk State University; <sup>2</sup>Chelyabinsk Gerontology Center, Chelyabinsk, Russia

The profile of cytokines and stress hormones (adrenocorticotrophic hormone – ACTH and cortisol) in the blood plasma of elderly people with different quality of life is investigated. Regardless of the quality of life of the elderly were significantly higher systemic levels of cytokines: IL-6, TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ , as compared to young individuals. In older people with high quality of life (group “active old age”) and cytokine concentration of IL-6 was significantly lower compared with those of people with an average (group of “intermediate type”) and low (group of “mercy”) quality of life. In the group of people with a poor quality of life (“mercy”) observed significantly higher levels of cortisol in the blood plasma at low background (at the level of the group of donors) ACTH.

*Keywords:* elderly, cytokines, adrenocorticotrophic hormone, cortisol.

### ИММУННАЯ РЕАКТИВНОСТЬ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ОСТРОМ ПАНКРЕАТИТЕ НА ФОНЕ АЛКОГОЛЬНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ

Бушмина О. Н., Быстрова Н. А., Локтионов А. Л., Долгарева С. А.

ГБОУ ВПО Курский государственный медицинский университет,  
Курск, Россия

При экспериментальном остром деструктивном панкреатите на фоне 30-дневной хронической алкогольной интоксикации, в большей степени при 60-суточной, установлено снижение формирования гуморального иммунного ответа, гиперчувствительности замедленного типа и фагоцитарных возможностей нейтрофилов периферической крови при повышении их кислородзависимой активности. Использование сочетания гепона, гипоксена и фосфоглив, в большей степени глутоксима, мексидола и гептрала, нормализовало и корригировало большинство измененных иммунных показателей при остром панкреатите на фоне 30-дневного введения этанола. При более длительном поступлении алкоголя эффективной оказалась последняя схема препаратов.

*Ключевые слова:* иммунная реактивность, острый панкреатит, этанол.



**Актуальность.** Течение и исход острого панкреатита во многом зависят от иммунной системы, участвующей в поддержании физиологического гомеостаза, регуляции метаболизма и регенерации тканей [2, 5]. Исходя из этого, в стратегии коррекции нарушений гомеостаза при данном заболевании значительную роль должны играть иммуностимулирующие препараты [1]. Однако, основным недостатком большинства существующих схем фармакотерапии острого панкреатита является то, что они не учитывают наличие фоновой патологии, во многом являющейся основополагающей и выполняющей роль преморбидного фона, а именно желчнокаменная болезнь, алиментарные факторы, злоупотребление алкоголем, причем последнее само по себе может быть причиной развития иммунных нарушений [3, 4].

**Цель работы.** Оценка фармакологической эффективности различных сочетаний иммуномодуляторов, антиоксидантов и мембранопротекторов в коррекции иммунных нарушений при экспериментальном остром деструктивном панкреатите (ОДП) на фоне хронической алкогольной интоксикации.

**Используемые методы.** Исследования проведены на 189 крысах породы Вистар массой 150–200 г. с соблюдением принципов, изложенных в Конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других целей. Хроническую алкогольную интоксикацию моделировали 30- или 60-кратным (ХАИ-30 и ХАИ-60), через 24 часа, внутрижелудочным введением 20% раствора этанола соответственно в дозах 3 и 2 мл/кг. Экспериментальный ОДП вызывали соответственно на 25 и 55 день после первого введения этанола перевязкой протока левой и правой долей поджелудочной железы, с последующей трехкратной через 60 мин стимуляцией прозеринем. Экспериментальных животных при ХАИ-30 делили на 3 равные части: в 1-й группе фармакологические препараты не вводили; 2-я группа получала Гепон (5 мг/кг, внутрь, через 24 часа, № 14), Гипоксен (750 мг/кг, внутрь в 1% крахмальной суспензии, № 14) и Фосфоглив (800 мг/кг, внутрь в 1% крахмальной суспензии, № 14); 3-я группа – Глутоксим (20 мг/кг, внутримышечно, через 24 часа, № 5), Мексидол (50 мг/кг внутривнутрибрюшинно, через 24 часа, № 5) и Гептрал (760 мг/кг, внутривнутрибрюшинно, через 24 часа, № 5). При ХАИ-60 одна часть животных по-

лучала только этанол, вторая – дополнительно глутоксим, мексидол и гептрал. Забой крыс осуществляли на 5-е сутки после иммунизации эритроцитами барана (ЭБ) или сенсibilизации ЭБ, а также через 24 часа последнего введения этанола и препаратов. Группа контроля состояли из 15 здоровых животных. Фагоцитарная активность нейтрофилов периферической крови оценивалась по фагоцитарному показателю (ФП), фагоцитарному числу (ФЧ) и индексу активности фагоцитоза (ИАФ). Кислородзависимую активность оценивали по НСТ-тестам спонтанному (НСТ-сп.) и стимулированному опсонизированным и неопсонизированным зимозаном (НСТ-ст. н/з, НСТ-ст. о/з), коэффициентам активации на опсонизированный и неопсонизированный зимозан, коэффициент опсонизации (Кан, Као, Ко). Выраженность гуморального иммунного ответа (ГИО) оценивали на пятые сутки после иммунизации ЭБ путем определения в селезенке числа антителообразующих клеток. Гиперчувствительность замедленного типа (ГЗТ) индуцировали внутривнутрибрюшинным введением  $10^8$  ЭБ (сенсibilизирующая доза). Через 4 суток в подушечку стопы правой лапки вводили  $10^6$  ЭБ в 0,1 мл физиологического раствора (разрешающая доза). О выраженности ГЗТ через 24 часа судили по разнице масс регионарного и контрлатерального лимфатических узлов и по разнице количества в них кариоцитов.

**Основные результаты.** У крыс с моделируемым ОДП на фоне ХАИ-30, в большей степени ХАИ-60, установлено выраженная супрессия формирования ГИО и ГЗТ, снижение ФП, ФЧ, ИАФ и повышение НСТ-сп., НСТ-ст. о/з и н/з. Однако резервы кислородзависимой активности фагоцитов (Као, Кан и Ко) оказались сниженными. Введение комбинации препаратов Гепон, Гипоксен и Фосфоглив крысам с ОДП в сочетании с 30-дневной ХАИ корригировало, но не до уровня нормы показатели ГИО, ГЗТ, ФП, ФЧ, ИАФ, НСТ-тесты спонтанный и стимулированный опсонизированным и неопсонизированным зимозаном, но в еще большей степени снижало функциональные резервы Кан и Ко. Введение сочетания Глутоксим, Мексидол и Гептрал нормализовало ГИО, ГЗТ, ФЧ, НСТ-ст. опсонизированным и неопсонизированным зимозаном, Кан, Ко и корригировало, но не до уровня нормы ФП, ИАФ, НСТ-сп., Као. Использование Глуток-

сима, Мексидола и Гептрала в условиях ОДП и ХАИ-60 нормализовало формирование ГИО, корригировало развитие ГЗТ, фагоцитарную активность полиморфноядерных лейкоцитов, НСТ-тесты спонтанный и стимулированные опсонизированным и неопсонизированным зимозаном, КАН, но не влияло на сниженные КАо и КО.

Таким образом, сочетание Глутоксим, Мексидол и Гептрал эффективно корригирует нарушения клеточного и гуморального иммунитета в условиях экспериментального ОДП на фоне хронической алкогольной интоксикации.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Азарова Ю.Э., Локтионов А.Л., Конопля А.И. и др. Медицинская иммунология – 2011. – Т. 13, № 4–5. – С. 514–515.
2. Горский В.А., Агапов М.А., Хорева М.В. Врач. – 2014. – № 7. – С. 47–49.
3. Конопля А.И., Лазаренко В.А., Локтионов А.Л. Курск: Изд-во ГБОУ ВПО КГМУ Минздрава России, 2013. – 162
4. Тарасенко В.С., Кубышкин В.А., Демин Д.Б и др. Хирургия. – 2013. – № 1. – С. 88–95.
5. Уханова И.Ю., Караулов А.В., Конопля А.И. и др. Клиническая лабораторная диагностика – 2011. – № 6. – С. 42–44.

## IMMUNE RESPONSIVENESS AT EXPERIMENTAL ACUTE PANCREATITIS AGAINST THE DRUNKENNESS

**Bushman O. N., Bystrova N. A., Loktionov A. L., Dolgareva S. A.**

*Kursk state medical university, Kursk, Russia*

At experimental acute destructive pancreatitis against a 30-day chronic drunkenness, more at 60-day, depression of formation of the humoral immune answer, a hypersensitivity of the slowed-down type and phagocytic opportunities of neutrophils of a peripheral blood when rising their oxygen activity is established. Use of a combination of a gepon, gipoksen and phosphoglyv, more a glutoksim, a meksidol and a geptral, normalized and corrected the majority of the changed immune indicators at acute pancreatitis against 30-day introduction of ethanol. At longer entering of alcohol effective was the last scheme of preparations.

*Keywords:* immune responsiveness, acute pancreatitis, ethanol.

## АПОПТОЗ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ЛИНИИ JURKAT ПОД ДЕЙСТВИЕМ ГАЛЕКТИНА-3

**Васильева О.А., Новицкий В.В.**

*ГБОУ ВПО Сибирский государственный медицинский университет  
Минздрава России, Томск, Россия*

Проведена оценка влияния рекомбинантного галектина-3 на реализацию запрограммированной гибели опухолевых клеток линии Jurkat. Установлено, что галектин-3 оказывает дозозависимое проапоптотическое действие *in vitro*, характеризующееся увеличением количества клеток с деполяризованной митохондриальной мембраной. При этом индукция апоптотической гибели опухолевых клеток линии Jurkat сопряжена с увеличением количества клеток, экспрессирующих гликопротеиновый рецептор CD45, через который возможно проведение сигнала внутрь клетки.

*Ключевые слова:* апоптоз, митохондриальный потенциал, галектин-3, клетки линии Jurkat.

**Введение.** Одним из перспективных направлений фундаментальных исследований является оценка влияния галектинов на реализацию

клеточных функций. В качестве регулятора клеточного гомеостаза в данной работе исследуется низкомолекулярный белок семейства

лектинов – галектин-3, секретирующийся клетками лимфоузлов, тимуса, селезенки, макрофагами, дендритными, эпителиальными и опухолевыми клетками. Галектин-3 функционирует как экстрацеллюлярная молекула и принимает участие в активации различных типов клеток, таких как моноциты, макрофаги, тучные клетки, нейтрофилы и лимфоциты [1, 2].

**Цель исследования:** оценить влияние рекомбинантного галектина-3 на реализацию апоптоза Т-лимфоцитов линии Jurkat в культуре *in vitro*.

**Материалы и методы.** В работе были использованы культуры опухолевых клеток линии Jurkat, представляющие собой иммортализованные Т-лимфоциты (Российская коллекция клеточных культур позвоночных Института цитологии РАН, Санкт-Петербург). Данные клетки представляют собой лимфобластную стадию дифференцировки Т-лимфоцитов, обладают способностью синтезировать ряд цитокинов и могут быть использованы как модель для изучения Т-лимфоцитов. Способность рекомбинантного галектина-3 («RnDSystems», США) вызывать апоптоз клеток линии Jurkat оценивали в диапазоне концентраций от 0,2 до 2,0 мкг/мл. Галектин-3 вводили в культуральную среду, и клетки инкубировали при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> в течение 18 ч. Контрольную группу составили клетки линии Jurkat, культивируемые в отсутствие галектина-3. Число клеток с признаками апоптоза и клеток со сниженным уровнем потенциала митохондриальных мембран ( $\Delta\psi$ ) определяли с помощью проточной цитофлуориметрии (FacsCantoII, BD, USA) с использованием наборов «Annexin V PE apoptosis detection kit», eBioscience, США) и DePsipher™ Kit (Trevigen, Inc., USA), соответственно. Содержание клеток, презентующих на своей поверхности рецепторы к галектину 3-го типа (CD29, CD45) определяли методом лазерной проточной цитофлуориметрии. Клетки окрашивали стандартными моноклональными антителами к данным рецепторам, мечеными фикоэритрином («RnDSystems», USA), согласно протоколу фирмы производителя. Результаты исследования выражали в процентах. Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы Statistica 6.0. Достоверность различий ( $P < 0.05$ ) оценивали с помощью непараметрического критерия Вилкоксона для зависимых выборок. Данные

представлены в виде медианы (Me), верхнего и нижнего квартилей (Q<sub>25</sub>-Q<sub>75</sub>).

**Результаты.** Оценка реализации апоптоза клеток линии Jurkat показала, что увеличение количества апоптотически измененных клеток происходит при действии галектина-3 в дозе 1,0 и 2,0 мкг/мл. Уровень апоптотических клеток при действии галектина-3 в дозе 1,0 мкг/мл составил 36,3 (27,5–45,1)%, что на 16% превышает таковой в интактной культуре клеток. С увеличением дозы галектина-3 количество аннексин-положительных клеток линии Jurkat значимо не отличается, однако в 2 раза возрастает количество клеток, связавших двойную метку (Annexin<sup>+</sup>7AAD<sup>+</sup>). Согласно данным литературы, вероятным механизмом реализации программированной клеточной гибели, индуцированной галектином-3, является митохондриальный путь. Универсальным признаком данного пути гибели клетки является снижение трансмембранного потенциала митохондрий, образованного градиентом протонов H<sup>+</sup>, за счет активации специфических каналов во внешней митохондриальной мембране. В результате окрашивания клеток, проведенного с помощью митохондриального зонда JC-1, нами было установлено, что в проапоптотических дозах галектин-3 приводит к деполяризации митохондриальной мембраны. Добавление в среду для культивирования опухолевых клеток рекомбинантного галектина-3 в дозе 1 мкг/мл сопровождалось увеличением в 2,2 раза количества клеток со сниженным митохондриальным потенциалом, при увеличении концентрации галектина-3 до 2,0 мкг/мл регистрировали повышение количества лимфоцитов, содержащих JC-мономеров в 3,1 раза. Согласно данным литературы эффективность действия галектинов в отношении запуска гибели Т-клеток может зависеть от экспрессии гликопротеиновых рецепторов клеточной поверхности (таких, как CD29 и CD45) и профиля гликозилирования [4]. Поэтому, помимо оценки базовых параметров реализации программированной гибели клеток, было проведено исследование количества внеклеточных рецепторов к галектину-3 на поверхности Т-лимфоцитов линии Jurkat методом проточной цитофлуориметрии. Как известно, галектины оказывают свое влияние на клетки-мишени через связывание углеводраспознающего домена с гликоконъюгатами клеточной поверхности, содержащими

определенные олигосахариды [3]. Инкубирование интактных клеток линии Jurkat с галектином-3 не вызывало достоверных изменений количества экспрессированных на поверхности клеток CD29 по сравнению со значениями в контроле. Средний уровень экспрессии CD29 на поверхности клеток линии Jurkat составил 39,7 (33,2–50,4)%. При этом после 18 ч инкубации опухолевых клеток с рекомбинантным галектином-3 регистрировалось достоверное увеличение маркера CD45 до 42,1 (35,4–55,2)% по сравнению с 33,4 (17,4–39,7)% в интактной культуре. Тирозинспецифическая фосфатаза (CD45) выполняет важную функцию в передаче сигнала внутрь клетки с Т-клеточного рецептора. Для лучшего функционирования молекула должна быть специфично ориентирована на мембране, при этом имеет значение фосфолипидное окружение. CD45 на мембране структурно близок к Т-клеточному рецептору и Т-клеточные линии, не экспрессировавшие CD45, были не способны к передаче сигнала, опосредованного через Т-клеточный рецептор [4]. Таким образом, вероятно, индукция апоптотической гибели лимфоцитов

при действии галектина-3 опосредована взаимодействием с CD45.

**Заключение.** В результате исследования влияния рекомбинантного галектина-3 на реализацию запрограммированной гибели Т-лимфоцитов линии Jurkat установлено, что галектин-3 оказывает дозозависимое проапоптотическое действие на *in vitro*, характеризующееся увеличением количества клеток с деполяризованной митохондриальной мембраной. При этом индукция апоптотической гибели опухолевых клеток линии Jurkat сопряжена с увеличением количества клеток, экспрессирующих гликопротеиновый рецептор CD45, через который возможно проведение сигнала внутрь клетки.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Васильева О. А. Российский иммунологический журнал. – 2014. – Т. 17, № 3. – С. 270-272.
2. Васильева О. А., Якушина В. Д., Рязанцева Н. В. и др. Молекулярная биология. – 2013. – Т. 47, № 6. – С. 1004-1010.
3. Рапопорт Е. М., Почечуева Т. В., Курмышкина О. В. и др. Биохимия. – 2010. – Т. 75. – № 3. – С. 380-390.
4. Stillman B. N., Hsu D. K, Pang M. et al. The Journal of Immunology. – 2006. – Vol. 176. – P. 778-789.

#### APOPTOSIS OF JURKAT CELLS UNDER THE ACTION OF GALECTIN-3

Vasil'eva O.A., Novitsky V. V.

*Siberian State Medical University, Tomsk, Russia*

The influence of recombinant galectin-3 on programmed death of Jurkat cells was analyzed in current work. It was shown that galectin-3 had a dose-dependent pro-apoptotic effect on Jurkat cells *in vitro*. Galectin-3 enlarged the number of cells with decreased mitochondrion membrane potential compared with intact cells. Induction of apoptotic death of Jurkat cells is associated with increasing the number of cells expressing a glycoprotein receptor CD45, through which signal transduction is possible into cell.

## ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ФАКТОРОВ, ФОРМИРУЮЩИХ АТОПИЧЕСКИЙ ФЕНОТИП БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ У ДЕТЕЙ

Воляник О. В., Дремова Е. Н., Терентьева С. Ю.,  
Матаева Ю. В.

ГБОУ ВПО Оренбургский государственный медицинский университет,  
Оренбург, Россия

Обследовано 50 пациентов. Результаты: все обследованные имели повышенный уровень IgE ( $245 \pm 16,8$  МЕ/мл). Отягощенная наследственность по аллергопатологии, патология беременности, родов наблюдалась примерно у половины детей. Раннюю манифестацию аллергопатологии имели 26% девочек и 48% мальчиков, проявлявшуюся в виде аллергического конституционального диатеза, атопического дерматита. Полученные результаты положительно свидетельствуют о роли преморбидного фона в формировании фенотипа астмы и о наличии у большинства обследованных детей предрасполагающих факторов для развития атопической бронхиальной астмы.

*Ключевые слова:* бронхиальная астма, дети, фенотип, атопия.

**Актуальность.** Согласно формулировке И.И. Балаболкина по соотношению роли средовых и наследственных факторов в патогенезе, аллергические заболевания относят к группе болезней, этиологическим фактором для которых является окружающая среда, но при этом на частоту возникновения и тяжесть их течения существенное влияние оказывает наследственная предрасположенность. Ранний возраст дебюта бронхиальной астмы считается неблагоприятным прогностическим признаком тяжелого течения заболевания (Национальная программа «Бронхиальная астма у детей. Стратегия лечения и профилактика», 2014).

**Цель:** изучить клинико-анамнестические особенности бронхиальной астмы, уровень IgE у детей.

**Материалы и методы:** исследованы и проанализированы данные анамнеза жизни и заболевания, уровень IgE у 50 детей: 27 мальчиков и 23 девочек в возрасте от 7 до 15 лет, больных бронхиальной астмой легкой средней степени тяжести.

**Результаты.** Средняя продолжительность течения заболевания составила  $6,8 \pm 3,1$  лет. У 30,0% пациентов давность постановки диагноза бронхиальной астмы не превышала 3-х лет. В нашем исследовании средний возраст начала болезни составил  $4,2 \pm 2,7$  года. У части

детей – 15,0% дебют заболевания пришелся на дошкольный период, когда яркие характерные клинико-анамнестические данные позволили поставить диагноз в возрасте от 1 до 3-х лет. Гораздо реже манифестация заболевания отмечалась в пубертатном периоде, в возрасте от 12 до 15 лет диагноз впервые был уточнен только у 5% наблюдаемых нами детей.

Как известно, в развитии бронхиальной астмы большую роль играет предрасположенность к аллергии наследственность. Так, риск развития аллергического заболевания в семьях, где аллергическим заболеванием страдает один из родителей, увеличивается до 50%, и превышает 66%, если аллергическим заболеванием страдают оба родителя. Отягощенная наследственность по аллергопатологии (атопический дерматит, бронхиальная астма, аллергический ринит) у девочек составила 59% по материнской линии и 8,4% по линии отца. У мальчиков предрасположенность к аллергическим заболеваниям выявлена в 44,6% случаев по материнской линии и в 22,3% случаев по линии отца. У 29,8% девочек отмечена аллергопатология во втором поколении по женской линии, у 6,9% – по мужской. В семьях 33,9% девочек сестры и/или братья имели аллергическую патологию. У 42,4% мальчиков отмечены аллергические

заболевания во втором поколении по женской линии, у 30,7% – по мужской.

Помимо генетических факторов, большая роль в формировании атопической бронхиальной астмы принадлежит различным внешнесредовым воздействиям. Неблагоприятные факторы начинают влиять на ребенка еще во внутриутробном периоде, вызывая формирование атопического фенотипа. Известно, что становление иммунной системы детей в периоде новорожденности в значительной степени связано с особенностями течения беременности у матери. Такое осложнение беременности как гестоз, не только приводит к формированию фетоплацентарной недостаточности, но и сопровождается выраженными нарушениями локального иммунного ответа на уровне плаценты, оказывающим негативное влияние на развивающийся плод. Гестозы, угроза прерывания беременности, сердечно-сосудистые и бронхо-легочные заболевания матери повышают риск внутриутробной сенсibilизации, влияют на синтез IgE у плода и способствуют развитию аллергических реакций и заболевания у ребенка вскоре после рождения.

Процент патологии беременности у матерей девочек в обеих подгруппах соответственно составил 59%, у матерей мальчиков – 55%. В большинстве случаев у матерей отмечался гестоз, нефропатия, анемия, угроза прерывания беременности. Патология родов (слабость родовых сил, стремительные роды, преждевременное излитие околоплодных вод, родостимуляция) наблюдалась у 29% матерей девочек и у 28,6% матерей мальчиков. Раннюю манифестацию аллергопатологии имели 26% девочек и 48% мальчиков, проявлявшуюся в виде аллергического конституционального диатеза, атопического дерматита.

Сопутствующие аллергические заболевания у детей отмечались в виде проявлений

атопического дерматита у 30,0±5,1%, поллиноза у 32,5±5,2%, отека Квинке у 10,0±3,4%, крапивницы у 10 12,5±3,7% детей.

Оценивая спектр сенсibilизации у наблюдаемых детей, было выявлено, что среди причинно-значимых аллергенов первостепенное значение имеют аллергены домашней пыли и клещей домашней пыли семейства *Dermatophagoides*. Большую долю в структуре сенсibilизации исследуемых пациентов составили также пыльцевые и эпидермальные аллергены. Важно отметить, что только 5,0±2,4% пациента имели сенсibilизацию к одному аллергену, по данным анамнеза и кожного аллергологического тестирования у 95,0±2,4% детей с бронхиальной астмой отмечалась поливалентная сенсibilизация.

Все обследованные имели повышенный уровень IgE (245±16,8 МЕ/мл).

Выводы: у детей, страдающих атопической бронхиальной астмой, наиболее часто прослеживалась отягощенная наследственность по материнской линии и во втором поколении по женской линии. У большинства детей аллергопатология проявлялась в раннем возрасте и прослеживается «атопический марш». Полученные нами результаты согласуются с данными И.И. Балаболкина (1985), С.М. Гавалова (1993), А.Г. Чучалина (1996), F. Riedel, С.Н.Л. Rieger (1988), указывающих на роль преморбидного фона в формировании атопии у детей, страдающих бронхиальной астмой.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Воляник О. В. Автореф. дис. на соиск. учен. степ. канд.мед. наук. – Оренбург, 2008. – 24 с.
2. Морозова И. М. Автореф. дис. на соиск. учен. степ. канд. мед. наук. – Москва. – 1998. – 23 с.
3. Польшнер С. А. Автореф. дис. на соиск. учен. степ. д-ра мед. наук. – 2008. – 44 с.
4. Праздников Т. В. Дисс. на соискание степени к.м.н. – Москва. 2009.

### EVALUATION OF THE INFLUENCE FACTORS IS FORMED ATOPIC ASTHMA IN CHILDREN

Volyanik O. V., Dremova C. N., Terentyeva S. Y., Mataeva J. V.

Orenburg State Medical University, Orenburg, Russia

50 patients were examined. Family history of allergy, pathology of pregnancy, childbirth, occurs in about half of the children. Early manifestation of allergy had 26% of girls and 48% boys, manifested in the form of allergic constitutional diathesis, atopic dermatitis. The obtained results indicate a positive role in the formation of premorbid phenotype of asthma and the presence of the majority of children surveyed predisposing factors for the development of atopic asthma.

## ВНУТРИВЕННАЯ ЛАЗЕРНАЯ ТЕРАПИЯ В ЛЕЧЕНИИ БОЛЬНЫХ С ПОЯСНИЧНЫМИ РАДИКУЛОПАТИЯМИ И ЕЕ ИММУНОКОРРЕГИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ

Восканян А. Р., Шумахер Г. И., Цигулева О. А.

*Алтайский государственный медицинский университет, Барнаул, Россия*

В статье отражены результаты лечения 110 больных с поясничными радикулопатиями в стадии обострения. Внутривенная лазерная терапия способствует нормализации артериального и венозного кровообращения в нижних конечностях и восстановлению нейрососудистых нарушений в них. Также отмечено иммунокорректирующее действие лазерной терапии. Однако полностью дефекты иммунной системы не компенсируются.

*Ключевые слова:* радикулопатия, лазерная терапия, иммунокоррекция, реовазография.

Дегенеративные заболевания позвоночника (ДЗП) распространены и нередко ведут к инвалидизации [1]. Чаще всего страдает поясничный отдел позвоночника. Это приводит к хронизации болевого синдрома и формированию осложнений. Наиболее выражены эти нарушения у больных с поясничными радикулопатиями (ПРП), что значительно затрудняет их лечение и осложняет прогноз в отношении инвалидности. В настоящее время разработаны схемы лечения больных с ПРП в стадии обострения, включающие: медикаментозную терапию, ортопедические мероприятия, рефлексотерапию, мануальную терапию, массаж, физиотерапию [3]. Несмотря на такое многообразие методов лечения хороший терапевтический эффект удается достичь лишь у 70% больных. Создание новых эффективных технологий лечения больных с ПРП в стадии обострения, в котором важная роль принадлежит иммунной аутоагрессии, является актуальной задачей [2, 4]. Одним из современных способов терапии ПРП является внутривенное лазерное облучение крови (ВЛОК). Основными механизмами лечебного эффекта ВЛОК являются: улучшение реологических свойств крови, сосудорасширяющее, противовоспалительное, анальгезирующее действие, повышение антиоксидантной активности крови, стимуляция регенераторных процессов, а также иммуномодулирующий эффект [5].

**Целью** нашего исследования являлось изучение эффективности ВЛОК в комплексном лечении больных с ПРП, оценка влияния ВЛОК на иммунную систему и микроциркуляцию.

Обследовано 110 пациентов с ПРП в стадии обострения, находившихся на лечении в неврологическом отделении клинической больницы на ст. Барнаул ОАО «РЖД». Компрессия корешка L5 отмечалась у 58 больных, S1 – у 52. Возраст больных варьировал от 20 до 65 лет, мужчин было 46, женщин – 64. Всем больным проводилось вертеброневрологическое обследование по методикам, разработанным Я.Ю. Попелянским и Ф.А. Хабировым, а также реовазография нижних конечностей. Оценка иммунологического статуса включала определение параметров CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup> методом непрямой иммунофлюоресценции, с использованием моноклональных антител. Исследованы сывороточные иммуноглобулины (IgG, IgA, IgM) методом иммуноферментного анализа. Изучался уровень воспалительных цитокинов: ИЛ-1, ИЛ-2, ИЛ-6. Оценивались параметры фагоцитоза: фагоцитарный индекс (ФИ), тест с нитросиним тетразолием (НСТ-тест) до и после стимуляции. ВЛОК проводился на лазерном терапевтическом аппарате «Матрикс-ВЛОК», с длиной волны излучения 0,63 мкм, мощностью излучения на конце световода 1,5-2 мВт. Время воздействия составляло 20 мин/сеанс, курс состоял из 10 ежедневных сеансов. Все больные были разделены на две группы, сопоставимые по полу, возрасту и клинике. 1 группу составили 56 больных ПРП, получавших стандартную медикаментозную терапию, рефлексотерапию, мануальную терапию. Во 2 группу вошли 54 пациента, получавших ВЛОК, помимо той же терапии. Контрольную группу составили 20 человек в возрасте от 20 до 65 лет.

Оценка эффективности лечения болевого синдрома проводилась по динамике клинического течения ПРП и данным визуальной аналоговой шкалы (ВАШ). До лечения ВАШ=8,6; у обследованных отмечались выраженные мышечно-тонические нарушения, которые сопровождались вегето-сосудистыми изменениями. При лечении у всех пациентов прослеживалась положительная динамика, нарастал объем активных и пассивных движений в позвоночнике, восстанавливался двигательный стереотип, происходило улучшение венозного и артериального кровотока. Результаты восстановления вегетативных функций в нижних конечностях основывались на показателях реовазографии. Показатели реовазографии ( $M \pm m$ ) были следующими:  $\alpha$  (сек) в контрольной группе –  $0,10 \pm 0,01$ , в 1 группе  $0,14 \pm 0,01$ , во 2 группе  $0,12 \pm 0,001$ ,  $p > 0,05$ ;  $\alpha/T$  (%) в контрольной группе  $10,5 \pm 0,62$ , в 1 группе  $13,7 \pm 0,81$ , во 2 группе  $11,9 \pm 0,80$ ,  $p > 0,05$ ; А (ом) в контрольной группе  $0,15 \pm 0,09$ , в 1 группе  $0,09 \pm 0,07$ , во 2 группе  $0,15 \pm 0,09$ ,  $p > 0,05$ ; ИПС (%) в контрольной группе  $45,6 \pm 2,4$ , в 1 группе  $72,6 \pm 7,4$ , во 2 группе  $54,6 \pm 3,7$ ,  $p > 0,05$ . Нейрососудистые нарушения на больной стороне достоверно чаще сохранялись у пациентов 1 группы. У больных, получавших стандартное лечение, сохранялось нарушение периферической гемодинамики. Дополнительное применение ВЛОК во 2 группе способствовало нормализации периферической гемодинамики, восстановлению показателей реовазографии до нормы или близко к норме. В остром периоде по параметрам иммунограммы определялось снижение  $CD3^+$  до  $45,8 \pm 3,5\%$ ;  $p > 0,05$ .  $CD4^+$  увеличивались до  $50,1 \pm 2,4\%$ ,  $p > 0,05$ .  $CD8^+$  снижались до  $25,4 \pm 1,9\%$ ,  $p > 0,05$ .  $CD16^+$  резко возрастали до  $36,6 \pm 1,6\%$ ,  $p > 0,01$ . Изменений маркера  $CD19^+$  не обнаружено, но выявлена дисиммуноглобулинемия: со снижением IgA до  $1,8 \pm 0,4$  г/л (норма – 4,2 г/л), увеличением уровня IgG

до  $18,5 \pm 1,5$  г/л (норма – 16 г/л) и отсутствие изменений со стороны IgM. Уровни ИЛ-1, ИЛ-2, ИЛ-6 были достоверно повышены. Неспецифический иммунитет был угнетен, со снижением ФИ и уровня НСТ 1 и НСТ 2. После курса общепринятой терапии в 1 группе ПРП иммунограмма приобретала тенденцию к восстановлению, но к норме не возвращалась. На фоне ВЛОК терапии у пациентов 2 группы происходила нормализация маркеров иммунной системы, за исключением  $CD4^+$  и  $CD16^+$ , остававшихся по-прежнему высокими.

**Выводы.** Сдвиги со стороны иммунологических показателей в острый период заболевания являются очевидным проявлением процессов воспаления и аутоагрессии (увеличение  $CD4$ , подъем провоспалительных цитокинов, дисиммуноглобулинемия, угнетение фагоцитарного звена). Лазеротерапия обладает иммунокорректирующим действием, как в отношении специфического иммунитета, так и фагоцитарной активности нейтрофилов. Однако полностью дефекты иммунной системы ВЛОК не компенсирует. При этом ВЛОК способствует нормализации артериального и венозного кровообращения в нижних конечностях и устранению нейрососудистых нарушений у больных с ПРП в стадии обострения.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Попелянский Я. Ю. Ортопедическая неврология (вертеброневрология) Руководство для врачей – Казань, 1997. – С. 152.
2. Щегольков А. М. // Журн. Пульмонология. – 2001. – № 1. – С. 11-17.
3. Хабиров Ф. А., Девликамова Ф. И. // Лечение нервных болезней. – 2002. – № 1 (6). – С. 3-9.
4. Гаткин Е. Я. // Лазерная медицина. – 2004. – т. 8, вып. 3 – С. 11-18.
5. Гейниц А. В., Москвин С. В., Ачилов А. А. Внутривенное лазерное облучение крови. – М. – Тверь, 2008. – С. 144.

### INTRAVENOUS LASER THERAPY FOR TREATING LUMBER RADICULOPATHY AND IMMUNOCORRECTIVE ACTION OF TREATMENT

Voskanyan L. R., Schumacher G. I., Tsiguleva O. A.

*Altai State Medical University, Barnaul, Russia*

The article presents the results of treatment of 110 patients with lumbar radiculopathy in the acute stage. Endovenous laser therapy helps to normalize the arterial and venous circulation in the lower extremities, and neurovascular disorders restore them. Revealed immunocorrective effect of laser therapy. However, to fully defects of the immune system are not compensated.

*Keywords:* radiculopathy, laser therapy, immunotherapy, rheovasography.



## ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ ЭКСПРЕССИЯ IL-17A/IL-17F ИНТАКТНЫМИ И АКТИВИРОВАННЫМИ CD4<sup>+</sup> Т-ЛИМФОЦИТАМИ НА ФОНЕ МЕЛАТОНИНА

Глебездина Н. С., Некрасова И. В.

ФГБУН Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения  
Российской академии наук, Пермь, Россия

Исследована способность мелатонина в физиологических (минимальной и максимальной) концентрациях индуцировать и/или регулировать синтез IL-17 интактными и активированными Т-лимфоцитами *in vitro*. Установлено, что гормон оказывает разнонаправленное действие на CD4<sup>+</sup>Т-клетки в зависимости от их активационного статуса: он индуцирует синтез IL-17A и IL-17F интактными Т-лимфоцитами, но не оказывает статистически значимого действия на активированные клетки. Эффекты мелатонина имели дозовую зависимость. Учитывая, что Th17-клетки играют важную роль в иммунной защите организма, регуляция их активности мелатонином, по-видимому, вносит вклад в этот процесс.

*Ключевые слова:* Th17, Т-лимфоциты, мелатонин.

Мелатонин – эпифизарный гормон, определяющий работу нервной и эндокринной систем организма. Наряду с этим, мелатонин способен эффективно регулировать иммунные реакции. Так, установлено, что гормон повышает пролиферативный ответ Т-лимфоцитов на поликлональную стимуляцию [1], усиливает активность субпопуляции Th1 и ингибирует апоптоз лейкоцитов [2]. Более того, показано участие эндогенного мелатонина в контроле иммунной системы – в частности, выявлена циркадная ритмичность в изменении субпопуляционного состава лейкоцитов, а также в сывороточных уровнях про- и противовоспалительных цитокинов [3, 4], и для ряда показателей установлена синхронность их изменения с колебанием уровня мелатонина [4]. Несмотря на очевидный интерес исследователей к иммуномодулирующей активности мелатонина, его эффекты в отношении важнейшей Т-клеточной субпопуляции – Т-лимфоцитов, продуцирующих IL-17 (Th17), остаются неизученными. Между тем, субпопуляция Th17, несмотря на небольшие размеры, играет принципиально важную роль в защите организма от экстраклеточных патогенов, в развитии воспаления и аутоиммунных реакций, в противоопухолевом иммунитете. И тот факт, что фактор дифференцировки

Th17 одновременно служит рецептором для мелатонина, гормона, уровень которого в организме не только колеблется в течение суток, но и существенно изменяется при некоторых физиологических и патологических состояниях, придает особую важность исследованию мелатонин-зависимого контроля данной Т-клеточной субпопуляции.

Цель настоящей работы – оценить в эксперименте *in vitro* эффекты экзогенного мелатонина в физиологических дозах в отношении синтеза Т-лимфоцитами IL-17.

Лейкоциты выделяли из гепаринизированной венозной крови здоровых доноров (средний возраст 25,1 ± 2,27 лет, n = 10) центрифугированием в градиенте плотности фиколла-верографина (1,077 г/см<sup>3</sup>). Полученную суспензию мононуклеарных клеток фракционировали далее на иммуномагнитных бусах для получения CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов – с помощью соответствующей системы для выделения (Invitrogen). CD4<sup>+</sup> Т-клетки культивировали 72 часа в среде RPMI1640 с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (“Serva”), 300 мкг/мл L-глутамин (“Serva”), 0,01M HEPES (“Sigma”) и 100 мкг/мл гентамицина (“Pharmacia”, Швеция) при 37°C и 5% CO<sub>2</sub> – без активатора (спонтанный вариант) или в условиях поликлональной активации (система

для активации на основе моноклональных антител к CD3/CD28, Invitrogen). Мелатонин вносили в культуру за 1 час до активации в конечных концентрациях 10 и 100 пкг/мл, соответствующих минимальному и максимальному физиологическому уровню гормона в крови [5]. Синтез ключевого цитокина Th17-клеток – IL-17 (двух изоформ – IL-17A/IL17F, различающихся по механизмам регуляции) оценивали по окончании культивирования по внутриклеточной экспрессии IL-17A/IL17F (проточной цитометрией, с использованием соответствующих моноклональных антител: анти-CD4\*PE/Cy5 (eBioscience), анти-IL-17A\*FITC (eBioscience), анти-IL17F\*PE (eBioscience) и набора фиксирующего/ пермеабилизирующего буферов для оценки внутриклеточных маркеров (Biolegend)), в том числе и в условиях рестимуляции культивируемых CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов (стимулирующий коктейль на основе PMA, 10 нг/мл и иономицина, 2 мкМ, Invitrogen) в присутствии ингибиторов внеклеточного транспорта (Invitrogen). При цитометрическом исследовании оценивали как процент CD4<sup>+</sup> Т-клеток, экспрессирующих конкретный маркер (цитокин), так и уровень экспрессии на клетках данного маркера, определяя среднюю интенсивность свечения (Middle Fluorescence Intensity, MFI; условные единицы). Статистический анализ проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента.

Установлено, что, мелатонин в физиологических концентрациях способен индуцировать синтез Т-лимфоцитами IL-17. Так, в культуре интактных CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов (72 ч.) гормон усиливал внутриклеточную экспрессию IL-17 (обеих изоформ – IL-17A и IL-17F), причем эффект гормона был дозозависим и наиболее выражен для высокой физиологической концентрации (процент CD4<sup>+</sup>IL-17A<sup>+</sup>-клеток для концентрации мелатонина 10 пкг/мл –  $2,87 \pm 0,643$ , для концентрации 100 пкг/мл –  $1,77 \pm 0,279$ , контроль –  $0,806 \pm 0,089$ ; процент CD4<sup>+</sup>IL-17F<sup>+</sup>-клеток для концентрации мелатонина 10 пкг/мл –  $1,98 \pm 0,514$ , для концентрации 100 пкг/мл –  $1,42 \pm 0,268$ , контроль –  $0,74 \pm 0,093$ ;  $p < 0,05$ ).

В условиях же поликлональной активации (антителами к CD3/CD28), стимулирующего действия мелатонина не выявлено. Более того, уровень экспрессии IL-17A в IL-17A-позитивных CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитах, определяемый как средняя интенсивность свечения (Middle

Fluorescence Intensity, MFI), был понижен (контроль –  $28,9 \pm 1,53$ , мелатонин в концентрации 10 нг/мл –  $17,7 \pm 1,10$ , мелатонин в концентрации 100 нг/мл –  $21,6 \pm 1,13$ ;  $p < 0,05$ ).

Аналогичные эффекты мелатонина в отношении активированных CD4<sup>+</sup> Т-клеток были выявлены и в экспериментах с рестимуляцией Т-лимфоцитов по окончании культивирования (форбол-12-миристат-13-ацетат (PMA) + иономицин) с одновременной блокадой экстраклеточного транспорта цитокинов. Причем более выражены они были для высокой физиологической концентрации и относились не только к IL-17A (MFI: контроль –  $31,8 \pm 5,10$ , мелатонин в концентрации 100 нг/мл –  $24,8 \pm 4,03$ ;  $p < 0,05$ ), но и ко второй изоформе данного цитокина, IL-17F (MFI: контроль –  $29,0 \pm 4,05$ , мелатонин в концентрации 100 нг/мл –  $21,6 \pm 3,19$ ;  $p < 0,05$ ).

В целом, проведенные исследования выявили способность мелатонина в физиологических концентрациях регулировать синтез Т-лимфоцитами IL-17 и, соответственно, дифференцировку Th17-клеток. При этом гормон оказывал дифференциальное действие на CD4<sup>+</sup> Т-клетки в зависимости от их активационного статуса: он индуцировал синтез IL-17A/IL-17F интактными Т-лимфоцитами, но не оказывал статистически значимого действия на активированные клетки. Эффекты мелатонина были дозозависимыми, что позволяет предполагать наличие *in vivo* циркадной ритмичности в отношении активности Th17 и, как следствие, изменения сывороточного уровня IL-17.

Работа поддержана грантом РФФИ № 14-04-31941.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Arias J., Melean E., Valero N., Pons H., Chacin-Bonilla L., Larreal Y., Bonilla E. Invest Clin 2003, 44, 41-50.
2. Espino J., Rodriguez A. B., Pariente J. A. J Pineal Res 2013, 54, 442-452.
3. Mazzoccoli G., Fontana A., Copetti M., Pellegrini F., Piepoli A., Muscarella L. A., Paziienza V., Giuliani F., Tarquini R.. Biomed Pharmacother 2011, 65 (1), 69-76.
4. Mazzoccoli G., Inglese M., De Cata A., Carughi S., Dagostino M. P., Marzulli N., Damato M., Grilli M., Giuliani F., Greco A. Geriatr Gerontol Int 2011, 11 (1), 98-106.
5. DeMuro R.L., Nafziger A.N., Blask D.E., Menhinick A.M., Bertino J.S. Jr. J Clin Pharmacol 2010, 40, 781-784.

## DIFFERENTIAL EXPRESSION OF IL-17A/IL-17F INTACT AND ACTIVATED CD4<sup>+</sup>T-LYMPHOCYTES IN THE BACKGROUND OF MELATONIN

Glebezdina N. S., Nekrasova I. V.

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

The ability of melatonin physiological (minimum and maximum) concentrations to induce and/or regulate the synthesis of IL-17 by intact and activated T-lymphocytes has been studied *in vitro*. The hormone was shown to have opposite effects toward CD4<sup>+</sup> T cells depending on their activating state: it induces IL-17A and IL-17F synthesis by intact T lymphocytes, but has no effects on the activated ones. The effects of melatonin were dose-dependent. In respect that Th17 plays important role in immune defence, the regulation of their activity by melatonin seems to contribute to the process.

*Key words:* Th17, T-lymphocytes, melatonin.

---

---

## ВЛИЯНИЕ СОТАЛОЛА ГИДРОХЛОРИДА НА ИММУННЫЙ ОТВЕТ И ФАГОЦИТАРНУЮ АКТИВНОСТЬ ПЕРИТОНЕАЛЬНЫХ КЛЕТОК КРЫС ПРИ ТИРЕОТОКСИКОЗЕ

Годовалов А. П., Зенков А. Л.

*ГБОУ ВПО Пермский государственный медицинский университет имени акад.  
Е. А. Вагнера Минздрава России, Пермь, Россия*

Установлено, что при введении антагониста бета-адренорецепторов периферического действия соталола гидрохлорида на фоне экспериментального тиреотоксикоза меняется состав перитонеальных клеток крыс и их фагоцитарная активность. Показано, что введение соталола гидрохлорида на фоне экспериментального тиреотоксикоза увеличивает количество нефагоцитирующих перитонеальных макрофагов.

*Ключевые слова:* экспериментальный тиреотоксикоз, бета-адренорецепторы, фагоцитоз

**Актуальность и цель работы.** Известно, что тироксин повышает фагоцитарную активность перитонеальных макрофагов и экспрессию бета-адренорецепторов на клетках иммунной системы [1, 2]. Однако участие адренергической регуляции в изменении функций перитонеальных мононуклеарных фагоцитов, нейтрофильных гранулоцитов и мастоцитов при экспериментальном тиреотоксикозе изучено недостаточно.

**Цель работы** – исследование влияния антагониста бета-адренорецепторов периферического действия соталола гидрохлорида на иммунный ответ, количественный состав и фагоцитарную активность перитонеальных

клеток крыс при экспериментальном тиреотоксикозе.

**Материалы и методы.** Эксперимент выполнен на 56 самцах белых крыс с исходной средней массой 313±4 г. Для моделирования тиреотоксикоза ежедневно подкожно вводили L-тироксин в течение 14 дней в суточной дозе 0,04 мг/кг массы тела. Неселективный антагонист бета-адренорецепторов соталола гидрохлорид вводили по 5 мг/кг 2 раза в день внутрибрюшинно в течение 14 суток. Крысы контрольной группы получали растворитель препаратов. На 10-е сутки от начала эксперимента всех животных сенсibilizировали эритроцитами барана (10<sup>8</sup> клеток подкожно

в правую стопу). На 4-е сутки после сенсibilизации вводили разрешающую дозу антигена ( $10^9$  эритроцитов в правую стопу). Через 24 ч (15-е сутки эксперимента) оценивали степень выраженности локального воспаления при реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) по индексу реакции, количество антителообразующих клеток (АОК) в регионарном (правом подколенном) лимфатическом узле методом локального гемолиза в геле агарозы, количественный состав перитонеальных клеток и их фагоцитарную активность по отношению к формализированным эритроцитам барана [3]. Статистический анализ результатов проводили с использованием методов описательной статистики, дисперсионного анализа и критерия Дункана для множественного сравнения между группами.

**Результаты и обсуждение.** Установлено, что введение тироксина крысам приводит к повышению степени выраженности воспаления при реакции ГЗТ ( $p < 0,05$  к контрольной группе) и увеличению абсолютного числа АОК в регионарном лимфатическом узле ( $p < 0,05$  к контрольной группе). Фармакологическая блокада бета-адренорецепторов соталолом гидрохлоридом не влияет на изменение числа АОК и усиливает стимуляцию реакции ГЗТ тироксином. При введении животным только соталолом гидрохлорида число АОК в регионарном лимфатическом узле не изменяется.

Абсолютное количество всех перитонеальных лейкоцитов в брюшной полости у крыс, получавших только тироксин, составляет  $164,2 \pm 2,7$  млн. ( $p < 0,05$  к контрольной группе), у крыс, получавших на фоне тиреотоксикоза соталолом гидрохлорид –  $150,1 \pm 9,6$  млн. ( $p > 0,05$ ), а в контрольной группе –  $132,1 \pm 15,6$  млн. клеток. Количественный состав перитонеальных клеток при введении животным с экспериментальным тиреотоксикозом соталолом гидрохлорида также существенно изменяется. Так, при совместном введении препаратов число лимфоцитов составляет  $59,2 \pm 4,8$  млн., в группе крыс с тиреотоксикозом –  $85,0 \pm 5,6$  млн. ( $p < 0,05$ ), а в контрольной группе –  $51,6 \pm 7,7$  млн. клеток. Введение соталолом гидрохлорида крысам с тиреотоксикозом приводит к увеличению количества перитонеальных мононуклеарных фагоцитов до  $45,6 \pm 5,0$  млн. ( $p < 0,05$  к контрольной группе), в то время как у животных с тиреотоксикозом оно не изменяется ( $32,4 \pm 1,9$  млн. у крыс, получавших только тироксин,

и  $27,5 \pm 5,3$  млн. клеток у животных контрольной группы;  $p > 0,05$ ). На число перитонеальных мастоцитов и нейтрофильных гранулоцитов соталолом гидрохлорид у животных с тиреотоксикозом статистически значимо не влияет. При проведении двухфакторного дисперсионного анализа не выявлено статистически значимого влияния взаимодействия факторов «тироксин» и «антагонист бета-адренорецепторов» на показатели клеточного состава перитонеальной полости экспериментальных крыс.

При оценке фагоцитарной активности перитонеальных клеток, установлено, что соталолом гидрохлорид статистически значимо увеличивает число не участвующих в фагоцитозе макрофагов у крыс с тиреотоксикозом. Относительное число фагоцитирующих макрофагов у крыс с тиреотоксикозом составляет  $61,77 \pm 2,41\%$  (в контрольной группе –  $63,48 \pm 2,09\%$ ,  $p > 0,05$ ), а у животных, получавших на фоне тиреотоксикоза соталолом гидрохлорид, снижается до  $46,19 \pm 3,63\%$  ( $p < 0,05$  к контрольной группе и к крысам с тиреотоксикозом). Аналогичная закономерность выявлена и при оценке относительного числа наиболее активно фагоцитирующих макрофагов. Абсолютное число нефагоцитирующих мононуклеарных фагоцитов у животных с тиреотоксикозом составляет  $1241 \pm 114$  в 1 мкл (в контрольной группе –  $992 \pm 194$  в 1 мкл;  $p > 0,05$ ), а у животных, получавших на фоне тиреотоксикоза антагонист бета-адренорецепторов, увеличивается до  $2288 \pm 220$  в 1 мкл ( $p < 0,05$  к контрольной группе и к крысам с тиреотоксикозом). Другие абсолютные показатели фагоцитарной активности перитонеальных макрофагов у крыс, получавших тироксин, соталолом гидрохлорид или их комбинацию статистически значимо не меняются.

Статистически значимые изменения фагоцитарной активности нейтрофильных лейкоцитов и тучных клеток у крыс с совместным введением тироксина и соталолом гидрохлорида отсутствуют. При проведении двухфакторного дисперсионного анализа не выявлено статистически значимого влияния взаимодействия факторов «тироксин» и «антагонист бета-адренорецепторов» на показатели фагоцитарной активности клеток перитонеальной полости экспериментальных животных.

Таким образом, при введении соталолом гидрохлорида на фоне экспериментального тиреотоксикоза выявлено изменение состава

клеток перитонеальной полости крыс. Установлено, что введение неселективного антагониста бета-адренорецепторов периферического действия соталола гидрохлорида при тиреотоксикозе модулирует поглотительную активность перитонеальных мононуклеарных фагоцитов крыс.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Годовалов А. П., Зенков А. Л. Вестник Уральской медицинской академической науки 2014, 3, 22-23.
2. Forner M. A., Barriga C., Ortega E. J Appl Physiol 1996, 80 (3), 899-903.
3. Шилов С. Ю., Шилов Ю. И., Черешнев В. А. Доклады Академии наук 2004, 396 (5), 707-709.

### INFLUENCE OF SOTALOL HYDROCHLORIDE ON IMMUNE RESPONSE AND PHAGOCYTOTIC ACTIVITY OF RAT PERITONEAL CELLS UNDER THYROTOXICOSIS

Godovalov A. P., Zenkov A. L.

*Acad. E. A. Wagner Perm State Medical University, Perm, Russia*

It was found that the injection to rats of beta-adrenoceptor antagonist with peripheral action sotalol hydrochloride under experimental thyrotoxicosis led to the changes in the number of peritoneal cells and their phagocytic activity. It was shown that the injection of sotalol hydrochloride against the background of experimental thyrotoxicosis increased the number of non-phagocytic peritoneal macrophages.

### ФЕНОТИП, ПРОЛИФЕРАЦИЯ И АПОПТОЗ ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПРИ ОСТРОМ ИНФАРКТЕ МИОКАРДА

Головизнин М. В.<sup>1</sup>, Лахонина Н. С.<sup>1</sup>, Донецкова А. Д.<sup>2</sup>, Никонова М. Ф.<sup>2</sup>, Стрюк Р. И.<sup>1</sup>, Тектова А. С.<sup>1</sup>, Кошкина Е. В.<sup>3</sup>, Тимофеев В. Т.<sup>4</sup>

<sup>1</sup>ГБОУ ВПО МГМСУ имени А. И. Евдокимова; <sup>2</sup>ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России; <sup>3</sup>ГКБ № 67 имени Л. А. Ворохобова; <sup>4</sup>ГБОУ ВПО РНИМУ имени Н. И. Пирогова, Москва, Россия

У больных острым инфарктом миокарда была обнаружена достоверная обратная корреляция между уровнем ТРЭК и апоптозом лимфоцитов крови. Одновременно с этим была выявлена сильная обратная зависимость между уровнем ТРЭК и CD45RA – мембранным маркером наивных Т-лимфоцитов. Все это позволяет предполагать, что апоптозу при ОИМ подвергаются наивные Т-клетки, в том числе, ТРЭК-позитивные, недавно вышедшие из тимуса. Положительная корреляция между сроком ОИМ и спонтанной пролиферацией ЛПК может свидетельствовать о «воспалительной готовности» клеток иммунной системы при этом заболевании.

*Ключевые слова:* инфаркт миокарда, апоптоз, иодид пропидия, Т-лимфоциты CD45RA<sup>+</sup>.

**Введение.** Участие Т-лимфоцитов, и других иммунокомпетентных клеток в патогенезе атеросклероза в настоящее время не вызывает сомнения, более того, аутоиммунные реакции против липопротеидов признаются ведущими в формировании атеросклеротической бляшки [1]. В связи с этим, иммунопатогенез острого инфаркта миокарда (ОИМ) как наиболее

драматическое проявление атеросклеротической болезни сердца, требует самого тщательного изучения.

**Цель работы** – изучение фенотипических и функциональных особенностей лимфоцитов периферической крови (ЛПК) у больных острым инфарктом миокарда (ОИМ) по сравнению с донорами и другой аутоиммунной патологией.

**Материалы и методы.** Было обследовано 30 больных ОИМ, 27 больных РА и 56 практически здоровых лиц. Кроме стандартного клинико-лабораторного обследования, у пациентов производили определение уровня Т-рецепторных эксцизионных колец (ТРЭК) реаранжировки альфа-цепи Т-клеточного рецептора, отражающих состояние дифференцировочной функции тимуса, и фенотипирование ЛПК с помощью проточной цитофлуориметрии. У 9 больных ОИМ определяли уровень спонтанной пролиферации и апоптоза лимфоцитов с помощью окрашивания йодидом пропидия и последующим цитометрическим анализом данных. Обработка результатов проводилась с помощью пакета программ STATISTICA 10.0.

**Результаты.** Во всех группах была выявлена достоверная отрицательная корреляция между уровнем ТРЭК и возрастом обследуемых. У больных ОИМ коэффициент корреляции составил  $-0,523$  ( $p=0,005$ ), у больных РА  $-0,442$  ( $p=0,027$ ), а у доноров  $-0,459$  ( $p=0,003$ ), что отражает возрастное снижение функции тимуса, более достоверное у больных ОИМ. Мы обнаружили статистически значимое по сравнению с донорами снижение уровня ТРЭК у больных ОИМ ( $p=0,006579$ ). При исследовании лимфоцитарного фенотипа в группе больных ОИМ достоверных отличий от доноров получено не было, в то время, как у больных РА выявлено достоверное по сравнению с донорами и ОИМ снижение уровня клеток  $CD3^+8^+$ . Вместе с тем, у больных ОИМ имелась достоверная отрицательная корреляция ( $R= -0,648$ ,  $p=0,03$ ) между сроком и уровнем клеток  $CD3^+8^+$  и достоверная сильная положительная корреляция между сроком ОИМ и пролиферацией ЛПК ( $R=0,708$ ,  $p=0,0496$ ). Наибольший уровень апоптоза ЛПК был также нами обнаружен у больных ОИМ по сравнению с донорами ( $p=0,057041$ ) и с больными РА ( $p=0,005479$ ). Также у больных ОИМ нами выявлена сильная, достоверная отрицательная корреляция между уровнем ТREC и апоптозом ЛПК ( $R= -0,867$ ) ( $p=0,0024$ ) и сильная отрицательная корреляция между уровнем ТREC и Т-клеточным антигеном CD45RA ( $R= -0,750$ ) ( $p=0,019942$ ).

**Выводы.** 1) Достоверная обратная корреляция между уровнем ТРЭК и апоптозом ЛПК позволяет нам предположить, что среди клеток, подвергающихся апоптозу при ОИМ в первую очередь находились «наивные» Т-лимфоциты,

в том числе, недавно вышедшие из тимуса. Подтверждением тому может служить обнаружение нами сильной отрицательной корреляции между уровнем ТРЭК и мембранным маркером «наивных» Т-клеток CD45RA.

2) Положительная корреляция между сроком ОИМ и спонтанной пролиферацией ЛПК может свидетельствовать о «воспалительной готовности» клеток иммунной системы при этом заболевании.

**Обсуждение.** Как свидетельствуют данные литературы, иммунологические события в периферической крови больных ОИМ еще ждут изучения и систематизации [2]. Нам встретились данные относительно апоптоза кардиомиоцитов при ОИМ, связанных с экспрессией на этих клетках маркеров апоптоза [3] и, буквально единичные сообщения об апоптозе ЛПК при ОИМ, обусловленном экспрессией на лимфоцитах антигенов семейства FAS [4]. Полученные нами результаты позволяют констатировать, что апоптозу при ОИМ в первую очередь подвергаются «молодые» Т-клетки, несущие на поверхности CD45RA. Отрицательная корреляция между уровнем ТРЭК и уровнем апоптоза лимфоцитов также позволяет предполагать, что программированной гибели подвергаются ТРЭК-позитивные Т-клетки, недавно вышедшие из тимуса. Обнаружение в крови больных ОИМ клеток  $CD3^+8^+$ , уровень которых повышен на ранних сроках инфаркта, требует дальнейшего осмысливания. Возможно, это «не-Т-клетки» с функцией моноцитов или естественных киллеров, равно как в их числе могут оказаться Т-лимфоциты, у которых антиген CD3 и связанный с ним Т-клеточный рецептор заблокированы аутоантигенами и циркулирующими иммунными комплексами.

Работа выполнена в рамках проектов № 12-04-09524 и № 14-04-32106 поддержанных грантами Российского фонда фундаментальных исследований.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Frangogiannis NG, Smith CW, Entman ML. *Cardiovasc Res.* 2002 Jan;53 (1):31-47.
3. Лахонина Н.С., Кошкина Е.В., Тимофеев В.Т. *Российский иммунологический журнал* 2013, т. 7 (16), № 3 С. 299
4. Misao J., Hayakawa Y., Ohno M. et al. *Circulation.* 1996; 94: 1506-1512
5. Pasqui A. L., Di Renzo M., Bova G. et al. *Clin Exp Med.* 2003 May;3 (1):37-44.

## PHENOTYPE, PROLIFERATION AND APOPTOSIS OF PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES IN MYOCARDIAL INFARCTION

Goloviznin M.V.<sup>1</sup>, Lakhonina N.S.<sup>1</sup>, Donetskova A.D.<sup>2</sup>, Nikonova M.F.<sup>2</sup>,  
Stryuk R.I.<sup>1</sup>, Tektova A.S.<sup>1</sup>, Koshkina E.V.<sup>3</sup>, Timofeev V.T.<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Moscow State University of medicine and dentistry named after A.I. Evdokimov; <sup>2</sup>Scientific research center Institute of Immunology; <sup>3</sup>Moscow municipal hospital № 67 named after L.A. Vorokhobov;

<sup>4</sup>Russian scientific research medical university named after N.I. Pirogov, Moscow, Russia

In acute myocardial infarction patients we found definite reverse correlation between TREC level and peripheral blood lymphocytes apoptosis. Simultaneously strong reverse correlation between TREC level and T-naïve cells receptor CD45RA was also detected. The mentioned above allows to suggest CD45RA<sup>+</sup>TREC<sup>+</sup>T-naïve cells apoptosis in myocardial infarction. The positive correlation between peripheral blood lymphocytes spontaneous proliferation and myocardial infarction duration can give evidence of immune cells readiness to participate in inflammation process in myocardial infarction patients.

**Key words:** Myocardial infarction, apoptosis, propidium iodide, CD45RA<sup>+</sup> T-lymphocytes.

---

## ФАГОЦИТАРНАЯ АКТИВНОСТЬ ЛЕЙКОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ ВЕНОЗНОЙ КРОВИ В ОТНОШЕНИИ *S. PNEUMONIAE* У МЕДИЦИНСКИХ РАБОТНИКОВ

Голоднова С.О.<sup>1</sup>, Слободчикова С.В.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>ГБОУ ВПО ПГМУ им. академика Е.А. Вагнера Минздрава России; <sup>2</sup>ФГБУН Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь, Россия

Изучена фагоцитарная активность лейкоцитов периферической венозной крови в отношении *S. pneumoniae* у медицинских работников. Установлено, что доля фагоцитирующих нейтрофилов и моноцитов в пробах крови медицинских работников в 5–6 раз ниже по сравнению с таковой в образцах крови доноров. В контрольном эксперименте, где в качестве объекта фагоцитоза был взят *S. aureus*, активность лейкоцитов в обеих группах была довольно высокой. Таким образом, интенсивность фагоцитоза пневмококков у лиц, занятых медицинской деятельностью, существенно снижена, что может объяснить низкую резистентность медицинских работников к пневмококковой инфекции.

**Ключевые слова:** *S. pneumoniae*, пневмококковая инфекция, фагоцитоз.

Медицинские работники, согласно данным литературы, являются иммунологически компрометированной популяцией, находящейся под воздействием агрессивных факторов больничной среды: контакт с инфекционными больными, химическими веществами, антибактериальными и другими лекарственными препаратами и пр., в связи с чем заболеваемость различными инфекциями в данной профессиональной группе превышает аналогичный показатель среди взрослого населения более чем в 7 раз [1]. Ранее нами было установлено, что уровень носительства *S. pneumoniae* у ме-

дицинских работников в 2,4 раза выше, чем у лиц, профессионально не связанных с медицинскими организациями. Установлено также, что клинические проявления пневмококковой инфекции у медицинских работников характеризуются более тяжёлым течением [2].

Учитывая изложенные выше факты, а также то, что фагоцитоз является основным механизмом защиты макроорганизма от инфекций, целью настоящего исследования явилось определение фагоцитарной активности лейкоцитов периферической венозной крови в отношении *S. pneumoniae* у медицинских работников.

**Материалы и методы.** Фагоцитарная активность лейкоцитов периферической венозной крови в отношении *S. pneumoniae* у медицинских работников изучалась в сравнительном выборочном скрининговом когортном эпидемиологическом исследовании, в котором приняли участие 34 медицинских работника (группа наблюдения) и 39 условно здоровых доноров крови, чья профессиональная деятельность не связана с медицинской практикой (группа сравнения). Группы были однородны по возрасту и не привиты против пневмококковой инфекции.

Пневмококки (клинический изолят) культивировали на кровяном агаре в течение суток, окрашивали в растворе флуоресцеина изотиоцианата (FITC) [3], помещали в раствор 10% глицерина, аликвотировали и замораживали при  $-80^{\circ}\text{C}$  [4]. В отдельном эксперименте в качестве объектов фагоцитоза использовали обезвреженный формалином *S. aureus* Cowan I («Пермское НПО «Биомед»), окрашенный FITC. FITC-меченные бактерии смешивали с гепаринизированной (25 ЕД/мл) венозной кровью, инкубировали 30 мин при  $+37^{\circ}\text{C}$  (конечная концентрация пневмококков в реакционной смеси была подобрана предварительно и составила  $6 \cdot 10^7$  кл/мл), лизировали эритроциты, лейкоциты отмывали и хранили на льду до анализа. Подсчёт фагоцитов, ассоциированных с бактериями, проводили методом проточной цитометрии по общепринятой методике на проточном цитофлуориметре BD FACSCalibur (Becton Dickinson, США) [3]. Достоверность различий определяли на основе t-критерия Стьюдента. Для определения средних величин использовали средние арифметические и их ошибки ( $M \pm m$ ).

**Результаты и обсуждение.** Результаты оценки интенсивности поглощения пневмококков лейкоцитами периферической венозной крови у медицинских работников и доноров крови показала, что у медицинских работников доля фагоцитирующих нейтрофилов составила  $11,7 \pm 1,1\%$ , моноцитов –  $9,0 \pm 0,8\%$  против  $62,6 \pm 1,9\%$  ( $P << 0,001$ ) и  $59,5 \pm 2,1\%$  ( $P << 0,001$ ) у доноров для нейтрофилов и моноцитов соответственно. Таким образом, интенсивность нейтрофильного и моноцитарного фагоцитоза в отношении *S. pneumoniae* у лиц, занятых медицинской практикой в 5-6 раз ниже, чем у представителей немедицинских профессий.

Вполне вероятно, что обнаруженные различия фагоцитарной активности свидетель-

ствуют о снижении общей резистентности организма медицинских работников к инфекционным агентам и не являются частным проявлением антипневмококкового иммунитета. Поэтому на следующем этапе мы оценили активность лейкоцитов в тех же группах по отношению к другому возбудителю – *S. aureus*. Результат оказался совершенно иной. В образцах крови, полученных от медицинских работников, и в контрольных пробах в поглощении стафилококков участвовало большое число нейтрофилов:  $76,7 \pm 3,5\%$  и  $86,1 \pm 2,3\%$  ( $P < 0,05$ ) соответственно. Подобные результаты были получены и для моноцитов:  $74,3 \pm 3,8\%$  и  $77,4 \pm 2,8\%$  ( $P >> 0,05$ ). Таким образом, интенсивность поглощения стафилококка лейкоцитами крови как в группе медицинских работников, так и в группе сравнения была достаточно высока.

Низкая интенсивность поглощения пневмококков лейкоцитами у медицинских работников может быть связана с состоянием клеток или их рецепторным аппаратом. Но, поскольку поглощение другого патогена не обнаружило столь выраженных отличий между группами, то более вероятно, что снижение поглощения пневмококков отражает количество опсонированных в образцах крови группы наблюдения.

В крови человека присутствуют так называемые натуральные антитела класса М, специфичные к различным серотипам капсульных полисахаридов пневмококка. Однако было показано, что эти антитела при введении их лабораторным животным не защищают последних от пневмококковой инфекции. В то же время, если животным ввести антитела, полученные после вакцинации доноров пневмококковой вакциной, это защитит реципиентов от пневмококковой инфекции. Источником таких защитных антител являются В-клетки маргинальной зоны селезёнки, формирование пула которых завершается к 2 годам жизни. Вакцинация вызывает активацию соответствующего клона, его пролиферацию, дифференцировку в IgM-, IgG- и IgA-секретирующие плазматические клетки без последующего формирования клеток памяти [5]. На основании вышесказанного можно предположить, что при частом контакте с пневмококками происходит некоторое истощение пула В-клеток маргинальной зоны, специфичных к капсульным полисахаридам пневмококка. Это, в свою очередь, может вызвать недостаточность опсонизирующих антител крови и отразиться на эффективности фагоцитоза, а также



стать причиной снижения концентрации IgA в секретах слизистых оболочек.

В заключение отметим, что, поскольку фагоцитоз является основным способом защиты макроорганизма от бактериальных инфекций, снижение фагоцитарной активности по отношению к *S. pneumoniae* скорее всего и будет одной из причин более частого инфицирования медицинских работников и более тяжёлого течения пневмококковых инфекций. Полученные результаты подтверждают необходимость отнесения медицинских работников к группе риска по пневмококковой инфекции.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Храпунова И. А. Автореф. Дис. Д-ра мед. Наук. Москва; 2004.
2. Николенко В. В., Фельдблюм И. В., Голоднова С. О., Воробьева Н. Н. Медицинский альманах. – 2014. – №4. – С. 30-35.
3. Пинегин Б. В., Ярилин А. А., Симонова А. В. и др. Пособие для врачей лаборантов. – Москва. – 2001. – С. 31-35.
4. Jomaa M., Yuste J., Paton J. C. et al. Infection and Immunity. – 2005. – Vol. 73. – No. 10. – P. 6852-6859.
5. Weill J. C., Weller S., Reynaud C. A. Annu. Rev. Immunol. – 2009. – Vol. 27. – P. 267-85.

## PHAGOCYTOTIC ACTIVITY OF LEUCOCYTES IN PERIPHERAL VENOUS BLOOD CONCERNING *S. PNEUMONIAE* IN MEDICAL PROFESSIONALS

Golodnova S. O.<sup>1</sup>, Slobodchikova S. V.<sup>1,2</sup>

*1Perm State Medical University named after Academician E. A. Wagner Ministry of Health of the Russian Federation; 2Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch of Russian Academy of Sciences, Perm, Russia*

It was studied the phagocytic activity of leucocytes in peripheral venous blood concerning *S. pneumoniae* in medical professionals. It was found that the percentage of phagocytic neutrophils and monocytes in blood samples among medical professionals in 5-6 times lower than the donors blood samples. The activity of leucocytes in the control experiment, when the object of phagocytosis was taken *S. aureus*, was high in both groups. Thus, the intensity of phagocytosis of pneumococci in people involved in medical activities is significantly reduced, it may explain the low resistance of medical professionals to pneumococcal infection.

*Keywords: S. pneumoniae, pneumococcal infection, phagocytosis.*

## ОСОБЕННОСТИ РЕАКЦИИ ТУЧНЫХ КЛЕТОК РЕФЛЕКСОГЕННЫХ ЗОН У КРЫС РАЗНОГО ВОЗРАСТА ПРИ СТРЕССЕ, ВЫЗВАННОМ ПЛАВАНИЕМ

Голощапова Ж. А., Головнева Е. С., Кравченко Т. Г.,  
Голощапова А. К., Агафонова Д. Д.

*ГБОУ ВПО Южно-Уральский Государственный Медицинский Университет Минздрава России; ГБУЗ ЦОСМП «Челябинский государственный институт лазерной хирургии», Челябинск, Россия*

В опытах на крысах показано, что плавание как стресс повышает дегрануляцию тучных клеток (ТК) в рефлексогенных зонах: дуга аорты, зоны бифуркации общей сонной артерии и сердца у животных в возрасте 1 и 3 месяца. Индекс дегрануляции ТК зависит от возраста животных: у взрослых он более чем в 2 раза выше, чем у молодых во всех исследованных зонах. После прекращения стрессового воздействия статистически значимые различия были выявлены только в показателях дегрануляции ТК зоны корня легкого у животных 1-месячного возраста и зоны сердца у 3-х месячных крыс. Тучные клетки рефлексогенных зон сосудов раньше и в меньшей степени реагировали на стресс, чем в миокарде.

*Ключевые слова:* тучные клетки, стресс, онтогенез.

Изучению функциональной активности тучных клеток (ТК), их распределению в организме и особенностям реакции при стрессе посвящено много исследований последних лет [1, 2, 3, 4, 5]. Показана разница ответной реакции ТК на стресс в разных органах. Известна роль ТК в аллергических и анафилактических реакциях, участие в приобретенном и врожденном иммунитете, воспалительных заболеваниях. Показано, что ТК могут секретировать провоспалительные медиаторы без дегрануляции клеток [3, 5]. Известно, что взаимосвязь нервных и гуморальных механизмов этой реакции осуществляется в межклеточном пространстве, в которое выделяются нейромедиаторы из нервных клеток и биологически активные вещества из ТК [4]. Одной из таких областей взаимодействия являются так называемые рефлексогенные зоны. В реакции ТК в таких зонах до сих пор остается много невыясненных вопросов, в частности, не изучалась зависимость ответа от возраста животного.

**Целью** настоящего исследования являлось изучение особенностей реакции ТК рефлексогенных зон у крыс разного возраста при стрессе, вызванном плаванием.

**Материал и методы.** Эксперимент был выполнен на 50 беспородных белых крысах в возрасте 1 (молодые) и 3 (взрослые) месяца, содержащихся в условиях вивария. Содержание животных, эксперименты и выведение из опытов проводили в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных», регламентированных в приложении к приказу МЗ СССР № 775 от 12.09.77. Выделяли контрольную и опытную группы, где стресс создавали плаванием животных в бочке в течение 5 минут с грузом, составляющим 20% от веса тела животного.

Объектом исследования были ТК в соединительной ткани рефлексогенных зон экспериментальных животных: в области бифуркации общей сонной артерии (ОСА), дуги аорты, корня легкого и сердца. Исследовали реакцию ТК сразу после прекращения стрессового воздействия и через 1 сутки. Материал для гистологических исследований подвергали стандартным методам обработки, окрашивали гематоксилином-эозином и толуидиновым синим (рН 2,0). Достоверность различий оценивалась по критерию Манна-Уитни

**Результаты исследования.** ТК по степени дегрануляции во всех исследуемых зонах

были разделены на 3 фракции: недегранулированные (целые) ТК; дегранулированные; ТК в виде «россыпи» гранул и лишенных ядер.

Было показано, что индекс дегрануляции ТК у животных контрольной группы во всех исследуемых зонах существенно зависит от их возраста. В возрасте 1 месяц дегрануляция ТК во всех исследуемых зонах ниже, чем у животных возраста 3 месяца в 2 и более раз ( $P$  от 0,006 до 0,03). При этом у крыс контрольной группы возраста 3 месяца уровень дегрануляции ТК в разных рефлексогенных зонах статистически не различались между собой. Сравнение индекса дегрануляции ТК в разных зонах у молодых животных возраста 1 месяц выявило статистически значимые отличия только в области сердца – он был почти в 2 раза ниже, чем в других зонах ( $P=0,006$ ). Необходимо отметить, что у молодых животных в контрольной группе не наблюдалось ТК с очень высокой степенью дегрануляции, когда клетки представляли собой «россыпь» гранул, в то время как у взрослых крыс такие клетки встречались, хотя и в небольшом количестве – не более 5%.

Результаты изучения степени дегрануляции ТК при стрессе, вызванном плаванием, у животных 3-х месячного возраста показали, что во всех исследованных зонах сразу после прекращения воздействия статистически достоверно возрастает число дегранулированных ТК по сравнению со значениями у контрольных животных ( $P$  от 0,001 до 0,0045). Подобные результаты получены и при исследовании спустя 1 сутки после прекращения стрессового воздействия ( $P$  от 0,01 до 0,006).

Сопоставление значений индекса дегрануляции ТК в разных исследованных зонах между собой у 3-х месячных крыс как сразу после прекращения стресса, так и спустя 1 сутки не выявило статистически достоверных отличий. Исключение составили показатели лишь в зоне сердца. Сразу после прекращения воздействия ИД составил 69,85 (66,8; 74,1), а спустя 1 сутки – 83,70 (81,40; 90,0),  $P=0,006$ . Тем не менее, повышение уровня дегрануляции ТК в области сердца было несколько меньшим, чем в других зонах. Эта тенденция повторяет результаты, полученные и при исследовании у контрольных животных.

Плавание животных в возрасте 1 месяц значительно повышает уровень дегрануляции ТК во всех исследованных зонах и в оба срока исследования по сравнению со значениями этих

показателей в контрольной группе. Разница эта была статистически значимой ( $P$  от 0,021 до 0,006).

При сравнении уровня дегрануляции ТК в зависимости от сроков, прошедших после прекращения стресса, статистически достоверные различия выявлены только в зоне корня легкого – уровень дегрануляции ТК повышается через 1 сутки по сравнению с предыдущим сроком исследования ( $P=0,037$ ).

Полученные результаты дают основание предположить, что адекватный уровень функциональной активности ТК в рефлексогенных зонах достигается постепенно, по мере взросления животного. Реакция мастоцитов на плавательный стресс объединяет как приспособление к физической нагрузке, так и аспект психологического стресса. Полученные данные согласуются с результатами, опубликованными другими авторами [2, 3, 4]. Локальное взаимодействие ТК и нервных окончаний происходит благодаря повышению во внеклеточном пространстве рефлексогенных зон концентрации нейромедиаторов и цитокинов, ферментов, пуриnergических соединений, выделяемых мастоцитами [4], что влияет как на характер генерации электрических потенциалов, так и на активность самих ТК.

#### Выводы.

1. Плавание вызывает статистически значимое повышение уровня дегрануляции ТК во всех изученных рефлексогенных зонах

по сравнению с данными контрольных групп в оба срока исследования у животных в возрасте как 1 месяц, так и 3.

2. Степень дегрануляции ТК зависит от возраста экспериментальных животных: у взрослых она выше, чем у молодых и не зависит от исследуемой зоны. Исключение – в область сердца у молодых животных, где ИД достоверно ниже, чем в других изученных рефлексогенных зонах.

3. При сравнении уровня дегрануляции ТК в зависимости от срока исследования после прекращения стрессового воздействия статистически значимые различия были выявлены только в зоне корня легкого у животных 1-месячного возраста и зоне сердца у 3-х месячных крыс.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кондашевская М. В. // Вестник РАМН. 2010. № 6. С. 49-54.
2. Арташян О. С., Юшков Б. Г., Храмова Ю. С. // Таврический медико-биологический вестник. 2012. Т. 15, № 3. ч. 1 (59). С. 22-26.
3. Юшков Б. Г., Черешнев В. А., Климин В. Г., Арташян О. С. Тучные клетки. Физиология и патофизиология – М.: ОАО «Издательство «Медицина», 2011. 240 с.
4. Синцов Д. Л., Головнева Е. С., Попов Г. К. // Вестник новых медицинских технологий. 2007. № 2. С. 25.
5. Theoharides T. C., Alysandratos K. D., Angelidou A. et al. // Biochim Biophys Acta. 2012. Vol. 1822 (1). P. 21-33.

### MAST CELL RESPONSE ON SWIMMING STRESS IN THE REFLEX ZONES OF RATS OF DIFFERENT AGES

Goloshchapova J. A., Golovneva E. S., Kravchenko T. G.,  
Goloshchapova A. K., Agafonova D. D.

*South Ural State Medical University; Chelyabinsk State Institute of Laser Surgery,  
Chelyabinsk, Russia*

The experiments on rats showed that swimming stress increased the degranulation of mast cells (MCs) in the reflex zones (the aortic arch, the zone of the common carotid artery bifurcation and heart) in animals aged 1 and 3 months. MC degranulation index depended on the age of animals: it is more than 2 times higher in adults than that in younger in all studied zones. After the cessation of stress, statistically significant differences were found only in MC degranulation in the lung root zone of 1 month old animals and the heart of 3-month rats. Mast cells of vascular reflex zones demonstrated early and less pronounced response to stress then in the myocardium.

*Key words:* mast cells, stress, ontogeny.

## НЕКОТОРЫЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ РЕАЛИЗАЦИИ ЭФФЕКТОВ КИССПЕПТИНА НА ФОРМИРОВАНИЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ TREG

Горбунова О. А., Ширшев С. В.

*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь, Россия*

Выявлено, что кисспептин, в концентрациях, сопоставимых с его уровнем в периферической крови во II–III триместрах беременности, усиливает формирование адаптивных регуляторных Т-клеток (Treg), одновременно повышая продукцию интерлейкин (IL)-10. Установлено, что ингибиторы CREB (белок, связывающий аденозин-3',5'-циклофосфат-чувствительный элемент) или тирозин/сериновой протеинкиназы (MEK1,2) достоверно угнетают формирование Treg и продукцию IL-10. Внесение кисспептина на фоне ингибиторов CREB или MEK1,2 достоверно угнетает формирование адаптивных Treg и продукцию IL-10.

*Ключевые слова:* кисспептин, регуляторные Т-клетки, MEK1,2, CREB.

Гормоны являются важными модуляторами функциональной активности клеток иммунной системы. Недавно открытый гормон – кисспептин регулирует функционирование гонадоста на гипоталамическом уровне, однако во время беременности продуцируется плацентой и, благодаря этому, появляется в системном кровообращении матери. С точки зрения иммунологии беременность представляет собой феномен полуаллогенной трансплантации, однако при физиологическом развитии процесса отторжения чужеродного трансплантата не происходит. Важную роль в поддержании толерантности в период беременности играют механизмы подавления иммунного ответа регуляторными Т-клетками (Treg), одним из них является продукция Treg цитокинов. IL-10, который помимо Treg также продуцируется Т-хелперами второго типа, ингибирует секрецию провоспалительных цитокинов [1].

Установлено, что клетки иммунной системы экспрессируют специфический мембранный рецептор для кисспептина – GPR54, относящийся к классу рецепторов G-protein-coupled receptors, ассоциированных с G<sub>q</sub> [2]. На клетках головного мозга показано, что кисспептин может активировать различные сигнальные пути. Один, из которых активирует фосфолипазу C<sub>β</sub>, катализирующую гидролиз фосфатидилинозитол-4,5-дифосфата, с образованием вторичных посредников [3]. Также известно, что кисспептин повышает уровень внутриклеточного

аденозин-3',5'-циклофосфата (сАМР), что приводит к активации протеинкиназы А (РКА) с последующим фосфорилированием CREB (белок, связывающий сАМР-чувствительный элемент) [3]. Еще один трансдукционный путь, включает активацию тирозин/сериновой протеинкиназы (MEK1,2); киназы, регулируемой внеклеточными сигналами (ERK) и активируемой митогенами протеинкиназы (MAPK) [4]. Однако способ передачи гормонального сигнала на иммунокомпетентные клетки практически не исследован.

**Цель работы** – исследование молекулярных механизмов реализации эффектов кисспептина в регуляции формирования и функциональной активности Treg.

**Материалы и методы.** В работе использовали фракционированную суспензию мононуклеарных клеток периферической крови 10 здоровых небеременных женщин репродуктивного возраста. Периферическую кровь забирали в фолликулярную фазу менструального цикла. Суспензию мононуклеаров получали центрифугированием в градиенте плотности фиколл-верографина (1,077 г/см<sup>3</sup>). Далее методом иммуномагнитной сепарации («Invitrogen», Норвегия) из суспензии мононуклеаров выделяли CD4<sup>+</sup>Т-лимфоциты. Затем клетки помещали в плоскодонный 96-луночный планшет (5·10<sup>6</sup>клеток/мл) в полную питательную среду и добавляли ингибитор CREB – KG-501 (2-naphthol-AS-E-phosphate)

в концентрации 25 мкМ или ингибитор MEK1,2 – U0126 (1,4-diamino-2,3-dicyano-1,4-bis [2-aminophenylthio] butadiene) в концентрации 25 мкМ. Клетки инкубировали в течение 1 ч при 37°C в условиях 5% CO<sub>2</sub>, затем вносили кисспептин (Кисспептин-54, Metastin, Synthetic, CALBIOCHEM, США), который использовали в физиологических концентрациях, соответствующих его уровню в периферической крови во II и III триместрах беременности, – 4,6 пМ/л и 9,6 пМ/л, соответственно [2]. В каждую лунку добавляли магнитные частицы с нанесенными анти-CD3/CD28 моноклональными антителами («Invitrogen», Норвегия), имитирующими физиологический путь активации Т-клеток через Т-клеточный рецептор, а также нейтрализующие анти-интерферон (IFN)- $\gamma$  и анти-интерлейкин (IL)-4 моноклональные антитела (10 мкг/мл, «eBioscience», США). Клетки инкубировали в течение 72 ч при 37°C в условиях 5% CO<sub>2</sub>.

По окончании инкубации в супернатантах культур оценивали уровень IL-10 иммуноферментным методом («ООО Цитокин», Россия, Санкт Петербург). Клетки отмывали, удаляя магнитные частицы, и оценивали фенотип лимфоцитов методом проточной цитометрии на цитофлюориметре («Becton Dickinson», США). Окрашивание поверхностных и внутриклеточных маркеров осуществляли согласно методике производителя моноклональных антител («eBioscience», США). Поскольку экспрессия транскрипционного фактора FOXP3 (forkhead box P3) является основным маркером Treg, их количество определяли как процент CD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> клеток (anti-human CD4<sup>+</sup>-FITC; anti-human Foxp3-PerCy-5.5) в гейте CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов. Достоверность различий между средними величинами оценивали по парному t-критерию Стьюдента.

**Результаты.** Кисспептин в концентрациях, характерных для II–III триместра беременности, достоверно усиливает формирование адаптивных Treg (CD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>) и параллельно, в независимости от используемой концентрации, повышает продукцию IL-10 в супернатантах фракционированных CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов.

Установлено, что блокада как CREB, так и MEK1,2 достоверно угнетает формирование адаптивных Treg (CD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>), что обусловлено с одной стороны прямым выключением CREB, который необходим для экспрессии FOXP3 [1, 5], с другой стороны, связано бло-

кадой MEK1,2, который принимает участие в формировании транскрипционного фактора AP-1 (activator protein 1), также усиливающим экспрессию FOXP3. Таким образом, показано участие вышеупомянутых сигнальных путей в индукции Treg. При параллельном определении уровня IL-10 в супернатантах фракционированных CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов выявлено, что на фоне ингибитора MEK1,2, но не CREB, продукция IL-10 снижается.

Внесение кисспептина на фоне ингибиторов CREB или MEK1,2 вне зависимости от концентрации достоверно угнетает формирование адаптивных Treg (CD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>) и продукцию IL-10. Прямо противоположные эффекты на формирование Treg и их функциональную активность, выявленные при внесении в культуру только кисспептина и кисспептина на фоне ингибиторов CREB или MEK1,2, говорит о прямом участии CREB и MEK1,2 в реализации иммуномодулирующих свойств гормона.

В целом, наше исследование показало, что усиление формирования Treg под действием кисспептина обусловлено, по-видимому, PKA-зависимой активацией CREB и MEK1,2, которые усиливают экспрессию FOXP3, возможно за счет кисспептин-опосредованного повышения внутриклеточного cAMP. По-видимому, cAMP и активируемая им PKA являются ключевыми факторами в регуляции кисспептином поляризации CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов. Наше исследование впервые показало, что на уровне клеток иммунной системы кисспептин задействует те же сигнальные пути, что и на клетках головного мозга. Таким образом, кисспептин, который появляется в циркуляции только во время гестации, является важным, ранее не учитываемым фактором, усиливающим иммунную толерантность организма матери к антигенам плода, что определяет, в конечном итоге, благоприятный исход беременности.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ширшев С. В. // Биологические мембраны. 2014. Т. 31. № 5. С. 303-322.
2. Horikoshi Y., Matsumoto H., Takatsu Y. et al. // J. Clin. Endocrinol. Metab. 2003. V. 2. P. 914-919.
3. Sukhbaatar U., Kanasaki H., Mijiddorj T. et al. // General and Comparative Endocrinology. 2013. V. 194. P. 94-101.
4. Castaño J.P., Martínez-Fuentes A.J., Gutiérrez-Pascual E. et al. // Peptides. 2009. V. 30. P. 10-15.
5. Haiqi H, Yong Z, Yi L. // Immunobiology. 2011. V. 216 (6). P. 678-85.

## SOME MOLECULAR MECHANISMS OF KISSPEPTIN EFFECTS ON THE TREG FORMATION AND FUNCTIONAL ACTIVITY

Gorbunova O. L. Shirshov S. V.

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

It was revealed that kisspeptin in concentrations comparable to its level in peripheral blood in II–III trimesters of pregnancy increases the formation of adaptive regulatory T cells (aTreg) and production of interleukin (IL)-10. It has been established that inhibitors of CREB (protein binding adenosine 3',5'-cyclophosphate-sensitive element) or tyrosine/serine kinase (MEK1,2) significantly inhibit the formation of Treg and IL-10. Adding kisspeptin on background CREB inhibitors or MEK1,2 significantly inhibits the formation of adaptive Treg and IL-10 production.

*Keywords:* kisspeptin, regulatory T cells, MEK1,2, CREB.

---

## ОЦЕНКА РОЛИ ВИТАМИНА Д И СОСТОЯНИЯ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ ПРИ ТЯЖЕЛОЙ СОЧЕТАННОЙ ТРАВМЕ

Горожин П. Ю., Павлов В. А.

*ГБОУ Тихоокеанский Государственный медицинский университет МЗ РФ  
(ГБОУ ВПО ТГМУ Минздрава России), Владивосток, Россия*

В статье представлен современный взгляд на взаимодействие витамина Д и иммунной системы. Освещён вопрос регуляции витамином Д врожденного и приобретенного иммунитета, через VDR-рецепторы. Обследовано 45 человек с тяжелой сочетанной травмой, из них 23 человека (51%) с выраженными нарушениями врожденного иммунитета и 22 человека (49%) без существенных нарушений в иммунограмме. Выявлено статистически значимое снижение уровня 25-ОН-витамина Д<sub>3</sub> у пациентов 1-й группы. У пациентов 2-й группы показатели 25-ОН-витамина Д<sub>3</sub> были в пределах референсных величин.

*Ключевые слова:* сочетанная травма, витамин Д, VDR-рецепторы, врожденный иммунитет, CD4<sup>+</sup> Т-лимфоциты, С/ЕВР- $\beta$ , антимикробные пептиды, кателицидин.

**Актуальность и цель работы.** Взаимодействие витамина Д и иммунной системы является одним из наиболее изученных из его эффектов. Активные его формы регулируют приобретенный и врожденный иммунитет, поскольку VDR-рецепторы представлены во многих клетках иммунной системы, таких как макрофаги, дендритические клетки, Т- и В-лимфоциты. Одной из функций витамина Д является содействие дифференцировке моноцитов в макрофаги, дендритические клетки и лимфоциты. Этими клетками представлена первая линия врожденного иммунитета, они играют важную роль в контроле над воспалительным процессом [1].

Множеством исследований подтверждено, что недостаток витамина Д или рецепторов к нему может являться причиной нарушений

функций врожденного и приобретённого иммунитета [2].

Известно, что у пациентов, имеющих заболевания, связанные с дефицитом витамина Д (рахит, хронические заболевания почек) высок риск развития инфекционных осложнений. Влияние витамина Д на иммунную систему может быть обусловлено механизмом обратной паракринной связи, посредством которой снижается воспалительный ответ, влиянием на дифференцировку CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов с подавлением их функции. Активная форма витамина Д также способствует дифференцировке моноцитов в зрелые макрофаги за счет индукции р2. С/ЕВР- $\beta$  (цитидин-цитидин-аденозин-аденозин-тимидин-связывающий протеин бета) является важным фактором транскрипции, который наделяет макрофаги антибактериальной,

противовирусной, противоопухолевой активностью и возможностью к синтезу IL-12. Вит. Д индуцирует C/EBP- $\beta$ , который влияет на дифференцировку моноцитов в макрофаги, увеличивает активность макрофагов и повышает их цитотоксичность. Таким образом, вит. Д усиливает защиту организма против бактериальных инфекций и подавляет опухолевый рост [3].

В 2007 году было обнаружено, что вит. Д может стимулировать синтез антимикробного пептида, кателицидина, находящегося внутри лизосом макрофагов и полиморфноядерных лейкоцитов. Кателицидин играет ключевую роль во врожденном иммунитете, при защите от бактериальных инфекций. Активная форма витамина Д регулирует функцию антимикробных пептидов в макрофагах, кератиноцитах, клетках легочного эпителия, миелинизированных волокнах [4].

Обнаружено, что активированный комплекс VDR + вит. Д воздействует на инфекцию, вызванную *Mycobacterium tuberculosis*, через подавление синтеза IL-12 и интерферона- $\gamma$ . Мета-анализ показал, что уровень витамина Д в плазме крови был значительно ниже у больных туберкулезом, чем в контрольной группе [2].

Найдена связь между дефицитом витамина Д и частотой встречаемости респираторных заболеваний (муковисцидоз, интерстициальных заболеваний легких, ХОБЛ). Обнаружено, что витамин Д подавляет реакцию отторжения органов после трансплантации. После трансплантации сердца витамин Д может быть эффективнее циклоспорина и не увеличивает вероятность инфекционных осложнений. После трансплантации почки витамин Д не только подавляет реакцию отторжения, но и снижает темп фиброобразования почечной ткани. В эксперименте доказано, что активные формы витамина Д могут подавлять развитие аутоиммунного энцефаломиелита, тиреоидита, диабета I типа, воспалительных заболеваний кишеч-

ника, системной красной волчанки. Изучение ревматоидного артрита показало, что имеется обратная связь, между активностью заболевания и уровнем витамина Д в плазме крови [5].

**Материалы и методы.** Обследовано 45 человек с тяжелой сочетанной травмой, из них 23 человека (51%) с выраженными нарушениями врожденного иммунитета и 22 человека (49%) без существенных нарушений в иммунограмме. Определение 25-ОН-витамина Д<sub>3</sub> проводилось методом электрохемилюминесценции. Статистическая обработка материала осуществлена с использованием программы «Биостат» с использованием *t*-критерия Стьюдента.

**Результаты.** Выявлено статистически значимое снижение уровня 25-ОН-витамина Д<sub>3</sub> у пациентов 1-й группы. Однако, при рассмотрении индивидуальных значений, существенное снижение показателей определено только в 68% случаев. У пациентов 2-й группы показатели 25-ОН-витамина Д<sub>3</sub> были в пределах референсных величин.

Таким образом, витамин Д регулирует врожденный иммунитет, может стимулировать синтез антимикробного пептида, кателицидина, играющего ключевую роль в защите против бактериальных инфекций. Дальнейшее исследование роли витамина Д может изменить представление о патогенезе тяжелой сочетанной травмы и разработать новые подходы в её лечении.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Zittermann A., Gummert J. F. *Nutrients* 2010, 2 (4), 408-425.
2. Schaubert J., Dorschner R. A., Coda A. B. et al. *Journal of Clinical Investigation* 2007, 117 (3), 803-811.
3. Toubi E., Shoenfeld Y. *Israel Medical Association Journal* 2010, 12 (3), 174-175.
4. Segaert S. *Journal of Investigative Dermatology* 2008, 128 (4), 773-775.
5. Hayes C. E., Nashold F. E., Spach K. M., Pedersen L. B. *Cellular and Molecular Biology* 2003, 49 (2), 277-300.

### EVALUATION OF THE ROLE OF VITAMIN D AND THE IMMUNE SYSTEM IN PATIENTS WITH MULTIPLE TRAUMA

Gorozhin P. Y., Pavlov V. A.

*Pacific State Medical University, Vladivostok, Russia*

The modern view on the interaction between vitamin D and immune system is represented in this article. We illustrate the problem of vitamin D mediated regulation of innate and adaptive immunity through VDR receptors. We investigated 45 patients with multiple traumas. 23 patients (51%) had serious disorders of innate immunity and 22 patients (49%) did not have any disorders of the immune system. There was detected low level of 25-OH-vitamin D<sub>3</sub> in first group and normal level of 25-OH-vitamin D<sub>3</sub> in second group. All values were statistically significant.

## АНАЛИЗ КОМПЛЕКСА ММР-9/ТИМР-1 У БОЛЬНЫХ С РАЗЛИЧНЫМИ ФОРМАМИ ИБС, ПОДВЕРГШИХСЯ СТЕНТИРОВАНИЮ КОРОНАРНЫХ АРТЕРИЙ

Грачев Н. И., Семенихин А. А., Турмова Е. П.,  
Гущина А. О., Крылов А. А.

ГОУ ВПО Тихоокеанский государственный медицинский университет,  
Владивосток, Россия

Выполнена оценка сывороточного уровня комплекса ММР-9/ТИМР-1 у 100 больных ишемической болезнью сердца (ИБС). Группы формировали по следующим критериям: форма ИБС, количество пораженных коронарных артерий, развитие интраоперационных или ранних послеоперационных неблагоприятных событий. Забор крови производился до операции стентирования, на 1-е и 7-е сутки. Выявлены достоверно низкие значения ММР-9/ТИМР-1 у больных ИБС по сравнению с контрольной группой, а также более высокий уровень ММР-9/ТИМР-1 у пациентов со стабильной стенокардией по сравнению с пациентами с острым инфарктом миокарда. Вне зависимости от формы ИБС значения ММР-9/ТИМР-1 достоверно снижались к 7-м суткам после операции.

*Ключевые слова:* металлопротеиназа, ингибитор, ишемическая болезнь сердца, стентирование.

Болезни системы кровообращения, первое место в структуре которых составляет ишемическая болезнь сердца (ИБС), являются основной причиной смертности в большинстве развитых стран мира [2]. Введение в клиническую практику коронарного стентирования привело к существенному пересмотру тактики ведения пациентов с ИБС. В связи с этим в современной литературе все больше внимания уделяется изучению гуморальных факторов врожденного иммунитета, как прогностических маркеров у данной категории больных. Немаловажную роль в иммунопатогенезе ИБС играет комплекс ММР-9/ТИМР-1. Увеличение активности ММР в атеросклеротической бляшке приводит к избыточному расщеплению внеклеточного матрикса, истончению фиброзной покрышки и дестабилизации бляшки [1]. Клинические исследования показали, что концентрация металлопротеиназы-9 в крови коррелирует с тяжестью сердечно-сосудистой патологии у пациентов со стабильной стенокардией [4]. Однако, ряд исследователей пришли к иным результатам и показали, что более высокий уровень ММР-9 коррелировал с относительной сохранностью левого желудоч-

ка и меньшими изменениями в его конечно-систолическом и конечно-диастолическом объемах. В то же время другие ученые не выявили связи между уровнем ММР-9 и показателями ремоделирования левого желудочка. Некоторые исследователи не установили значимости ММР-9 в качестве фактора риска острого коронарного синдрома и ОИМ [5]. Активность металлопротеиназы регулируется при помощи тканевого ингибитора матричной металлопротеиназы, в частности первого типа (ТИМР-1). Несоответствие между ММР и ТИМР может привести к чрезмерной активности ММР, и, следовательно, к патологическим изменениям в сосудистой стенке. На данный момент результаты исследований, посвященных изучению концентрации ТИМР-1 у пациентов с коронарным заболеванием противоречивы. Так часть исследований показали снижение его уровня у пациентов с острым инфарктом миокарда, тогда как в других он оказался повышенным. Некоторые авторы оценивали уровень ММР-9 и ТИМР-1 у пациентов с сердечной недостаточностью и показали, что высокий уровень ТИМР-1, а не ММР-9 является независимым предиктором смертности [3]. Таким обра-



зом, несмотря на устоявшиеся лабораторные и инструментальные методы диагностики, на данный момент, вследствие переосмысления патологических механизмов формирования атеросклероза и состояний, которые, по сути, является его осложнением, необходимо изучать новые маркеры неблагоприятных исходов у пациентов с ИБС.

**Цель исследования.** Оценить содержание комплекса ММР-9/ТИМР-1 в сыворотке крови у больных с различными формами ИБС до и после первичного чрескожного коронарного вмешательства.

**Материалы и методы исследования.** В исследование вошли 100 пациентов обоего пола от 45 до 74 лет с ишемической болезнью сердца, подвергшиеся стентированию коронарных артерий. Группы пациентов формировали в зависимости от формы ИБС, от степени поражения коронарного, а также по развитию интраоперационных или ранних послеоперационных неблагоприятных событий. Контролем служили сыворотка крови 30 практически здоровых лиц. Забор крови производился до вмешательства, на 1-е и 7-е сутки после операции. Определение комплекса ММР-9/ТИМР-1 в сыворотке крови производили методом твердофазного ИФА с использованием реактивов «R&D Diagnostics Inc.», USA. Для математической обработки полученных данных использовали программу StatPlus 2009 и непараметрический U-критерий Манна-Уитни. Статистически достоверным считали различия при уровне значимости  $p < 0,05$ .

**Результаты.** Нами выявлены достоверно низкие значения комплекса ММР-9/ТИМР-1 у больных с ОИМ (9,87 (9,56-10,46) нг/мл) и со стабильной стенокардией (10,56 (8,9-10,92) нг/мл) по сравнению с контрольной группой здоровых лиц (11,4 (11,3-12,6) нг/л,  $p < 0,01$ ). Это позволяет сделать вывод о снижении развития риска ИБС при более интенсивном связывании ММР-9 ингибиторами. Достоверные различия также достигнуты между группами с ОИМ (9,87 (9,56-10,46) нг/мл) и стабильной стенокардией (10,56 (8,9-10,92) нг/мл) ( $p < 0,05$ ). Это, вероятно, связано с более выраженной агрессией на сосудистую стенку и атеросклеротическую бляшку (АСБ) свободной ММР-9, инициацией разрыва покрышки АСБ, тромбоза и вследствие ОИМ.

В группе со стабильной стенокардией отмечалось снижение уровня комплекса ММР-9/ТИМР-1 к 7 суткам после операции (9,50 (9,27-9,67) нг/мл) по сравнению со значениями до вмешательства (10,56 (8,9-10,92) нг/мл) ( $p < 0,05$ ). Анализ уровня ММР-9/ТИМР-1 в сыворотке крови больных ОИМ также выявил снижение значений данного комплекса к 7 суткам послеоперационного периода (9,16 (8,73-9,82) нг/мл) по сравнению уровнем до интервенции (9,87 (9,56-10,46) нг/мл) ( $p < 0,05$ ). Эти изменения, по всей видимости, связаны с имплантацией стента, повреждением эндотелия и усилением воспалительной реакции в интима артерий. Изучение концентрации ММР-9/ТИМР-1 в зависимости от количества пораженных коронарных артерий и развития ранних послеоперационных неблагоприятных событий не выявило статистически значимых различий в группах.

**Выводы.** Таким образом, ММР-9/ТИМР-1 может рассматриваться в качестве дополнительного маркера острого повреждения миокарда, наряду с общепринятыми биохимическими показателями. Имплантация стента в коронарную артерию сопровождается усилением воспалительной реакции в эндотелии, снижая сывороточный уровень ММР-9/ТИМР-1. Изучение ММР-9/ТИМР-1 в комплексе с цитокинами, вероятно, сможет позволить более точно прогнозировать неблагоприятные события в отдаленном послеоперационном периоде больных с различными формами ИБС, что требует проведение дальнейших исследований с оценкой отдаленных результатов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Полонская Я. В., Чернявский А. М., Волков А. М. и др. // Бюллетень СО РАМН. 2011. Т. 31. № 5. – С. – 25-31.
2. Finegold J. A., Asaria P., Francis D. P. // International Journal of Cardiology. 2013. 168 (2). – С. – 934-945.
3. Furenes E. B., Opstad T. B., Solheim S. et al. // Mediators of Inflammation. 2014. Vol. 2014. – С. 1-9.
4. Opstad T. B., Arnesen H., Pettersen A. A., Seljeflot I. // PLoS One. 2014. V. 9. № 9. – С. 1-7.
5. Tallant, C., Marrero A., Gomis-Rüth FX. // Biochim Biophys Acta. 2010. 1803 (1). – С. – 20-28

## ANALYSIS OF COMPLEX MMP-9/TIMP-1 IN PATIENTS WITH VARIOUS FORMS OF CORONARY ARTERY DISEASE UNDERGOING PERCUTANEOUS CORONARY INTERVENTION

Grachev N. I., Semenikhin A. A., Turmova E. P., Guschina A. O., Krilov A. A.

*Pacific State Medical University, Vladivostok, Russia*

We evaluated serum levels of MMP-9 complex / TIMP-1 in 100 patients with coronary artery disease (CHD). Patient groups were formed according to the following criteria: a form of CHD, the number of diseased coronary arteries, the development of intraoperative or early postoperative adverse events. Blood sampling was performed before percutaneous coronary intervention (PCI), on the 1st and 7th postoperative day. Values were significantly lower MMP-9 / TIMP-1 in patients with coronary heart disease as compared to a control group and a higher level of MMP-9 / TIMP-1 in patients with stable angina pectoris when compared with patients with acute myocardial infarction. Regardless of the form of CHD values of MMP-9 / TIMP-1 significantly decreased by day 7 after surgery.

---

---

## ПОКАЗАТЕЛИ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ МОНОЦИТОВ ПРИ РАННИХ ФОРМАХ ХРОНИЧЕСКОЙ ИШЕМИИ МОЗГА В УСЛОВИЯХ ГИПЕРЛИПИДЕМИИ

Давыдова Е. В.

*ГБОУ ВПО Южно-Уральский государственный медицинский университет,  
Челябинск, Россия*

Изучение функциональной активности моноцитов при ранних формах хронической ишемии мозга на фоне гиперлипидемии показало активацию моноцитопоза, усиление адгезивных, биоцидных свойств клеток, увеличение пролиферативного потенциала моноцитов вне зависимости от характера сосудистой патологии, что в совокупности вносит вклад в развитие атеросклероза и создает предпосылки к истощению функциональных возможностей моноцитов в условиях прогрессии хронической ишемии мозга.

*Ключевые слова:* ранние формы хронической ишемии мозга, гиперлипидемия, моноциты.

Одним из ведущих факторов риска развития ранних форм хронической ишемии мозга является гипертоническое и/или атеросклеротическое поражение сосудистого эндотелия. Повышение уровня атерогенных фракций липопротеинов с последующей их перекисной модификацией приводит к формированию эндотелиальной дисфункции. Показано, что гиперхолестеринемия усиливает экспрессию VCAM-1 на эндотелии аорты. На поверхности моноцитов и лимфоцитов в активном состоянии находится молекула VLA-4, основной антирецептор для VCAM-1, что объясняет селективную адгезию мононуклеаров к интима артерий при раннем проявлении атеросклероза [1]. Активно исследуется роль

моноцитов, которые относятся к антиген-презентирующим клеткам и являются ключевыми участниками иммуноопосредованных процессов. В процессе инициальных атеросклеротических событий происходит адгезия мононуклеаров к эндотелиальной стенке сосуда. Малоизученными на сегодняшний день остаются вопросы функциональной активности моноцитов, их адгезивная, бактерицидная, цитокин- и нитроксидергическая активность, пролиферативный потенциал при нормо- и гиперлипидемическом профиле крови больных с ранними формами хронической ишемии мозга.

Целью исследования явилось изучение функциональной активности моноцитов

на фоне гиперлипидемии при ранних формах хронической ишемии мозга.

**Материалы и методы.** Исследование проводилось на базе ГБУЗ Челябинского областного клинического терапевтического госпиталя для ветеранов войн. В исследование включены 122 ветерана Афганистана, средний возраст  $46,6 \pm 3,4$  года с ранними формами хронической ишемии мозга. Согласно классификации Шмидта Е. В. (1985) [2], ранние формы хронической ишемии мозга (ХИМ) включают начальные проявления нарушений кровоснабжения мозга (НПНКМ) и дисциркуляторную энцефалопатию 1 стадии (ДЭП-1). В первую группу вошли 78 ветеранов с НПНКМ, вторую составили 44 пациента с ДЭП-1 стадии. Диагноз НПНКМ и ДЭП-1 верифицирован на основании данных клинико-неврологического и инструментального исследований. Контрольную группу составили условно-здоровые мужчины (30 чел., средний возраст  $43,5 \pm 4,2$  года).

Кровь забирали из локтевой вены, в утренние часы, спустя 12-14 часов после приема пищи. Исследование липидного статуса включало определение концентрации общего ХС, ХС ЛПВП, ТГ (ммоль/л) на биохимическом анализаторе ФП-901М фирмы «Labsystems» (Финляндия). Для изучения фракции мононуклеаров клетки выделяли на фиколл-верографин-градиенте. Адгезивную способность мононуклеаров определяли путем их адгезии на пластик (выражали в%) и спектрофотометрически («Multiscan Plus», Финляндия). Проведение спонтанного и индуцированного МТТ-теста осуществляли спектрофотометрическим методом. МТТ-тест основан на восстановлении бесцветной соли 3-4,5-диметилтиазол-2-ил-2,5-дифенилтетразоля бромида (МТТ-краситель) митохондриальными и цитоплазматическими дегидрогеназами живых метаболически активных клеток с образованием голубых кристаллов формазана. Результат учитывали на спектрофотометре «Multiscan Plus» при длине волны 560 нм. Индекс стимуляции рассчитывали по формуле ОП опыта / ОП контроля.

Пролиферативную активность мононуклеаров с флуориметрической оценкой результатов проводили после 48-часовой инкубации клеток, с последующим добавлением витального красителя AlamarBlue® (Invitrogen, USA). Флюоресценцию измеряли через 4 часа на флуориметре VersaFluor (Bio-Rad) при длине волны возбуждения 390 нм, эмиссии 620 нм

и выражали в относительных единицах флюоресценции (ОЕФ, Relative Fluorescent units, RFU). Достоверность различий оценивали в рамках программы STATISTICA vers., согласно критериям непараметрической статистики (Колмогорова-Смирнова, U-test Mann-Whitney).

**Результаты и обсуждение.** Определение липидного профиля крови ветеранов с ранними формами ХИМ в сравнении с группой контроля показало наличие нарушений липидного обмена у 54% пациентов с НПНКМ и у 73% ветеранов с ДЭП-1 стадии. При этом уровень общего холестерина при НПНКМ, согласно классификации гиперхолестеринемий NCEP и Европейского общества по изучению атеросклероза (2001), соответствовал погранично-высокому ( $5,2-6,2$  ммоль/л) определяя умеренный тип гиперхолестеринемии. Контрольная группа, по условиям выборки, соответствовала критериям нормолипидемии. Установленные различия липидного спектра сыворотки крови у пациентов с ранними формами ХИМ в сравнении с группой здоровых мужчин подтверждают общепризнанные представления о роли гиперхолестеринемии в качестве важного модифицируемого фактора риска развития церебрального атеросклероза и связанных с ним хронических нарушений кровоснабжения мозга.

Исследование функционального состояния моноцитов крови у пациентов с ранними формами ХИМ на фоне гиперлипидемии и при нормолипидемическом профиле крови, показало наличие максимально высокого абсолютного количества моноцитов в группах пациентов с ранними формами ХИМ имеющих гиперлипидемию ( $90,94 \pm 0,02 \times 10^9$ /л (НПНКМ);  $0,96 \pm 0,1 \times 10^9$ /л (ДЭП-1) в сравнении с пациентами имеющими нормолипидемию ( $0,76 \pm 0,04 \times 10^9$ /л и  $0,79 \pm 0,03 \times 10^9$ /л соответственно), что отражает усиление моноцитопоза в условиях гиперлипидемии вне зависимости от характера изучаемой сосудистой патологии мозга. Пролиферативная активность мононуклеаров пациентов с ДЭП-1 оказалась также достоверно выше ( $72,9 \pm 3,8$  RFU), чем в группах с нормолипидемией ( $56,4 \pm 2,7$  RFU), что указывает на участие мононуклеаров в иммунных механизмах атерогенеза. Процент адгезии мононуклеаров, верифицированный с помощью микроскопической визуальной оценки адгезии клеток на пластик,

у пациентов с ранними формами ХИМ с гиперлипидемией на уровне тенденции, не достигающей степени статистической достоверности, был выше, чем в группах с нормолипидемией. При спектрофотометрическом варианте оценки этого теста показатели оптической плотности (RFU) в группах с НПНКМ ( $0,381 \pm 0,04$ ) и ДЭП-1 ( $0,389 \pm 1,5$ ) стадии превышали показатели в группах с нормальным уровнем липидов в крови ( $0,144 \pm 0,05$  и  $0,197 \pm 0,03$  соответственно), что отражает наличие активации моноцитов в данных условиях.

Для оценки участия мононуклеаров в инициации оксидативного стресса [3], исследована МТТ-активность клеток. Установлено, что моноциты больных с ранними формами ХИМ, имеющими гиперлипидемию, как в спонтанной, так и в меньшей степени в индуцированной ЛПС *S.typhi* МТТ-пробах, характеризуются достоверным увеличением показателей в сравнении с пациентами имеющими нормальные уровни липидов в крови, что отражает рост внутриклеточной продукции активных форм кислорода и вклад моноцитов в развитие оксидативного стресса при ранних формах ХИМ. Индекс стимуляции МТТ-теста в группе с НПНКМ достоверно отличался от показателей группы НПНКМ с нормолипидемией.

Таким образом, полученные данные указывают на активацию моноцитов/макрофа-

гов при инициальных событиях атерогенеза, о чем свидетельствует рост абсолютного числа моноцитов в кровотоке, усиление процессов адгезии, повышение внутриклеточной продукции активных форм кислорода и увеличение пролиферативного потенциала при гиперлипидемии у пациентов с ранними формами ХИМ, что подтверждает вклад моноцитов в развитие оксидативного стресса и, тем самым, через окислительную модификацию липопротеидов, в развитие атеросклероза церебральных сосудов и прогрессию хронической ишемии мозга. Избыточная активация моноцитов в условиях гиперхолестеринемии создает предпосылки к истощению функциональных возможностей данных клеток и диктует необходимость проведения комплексной эфферентной терапии, направленной на нормализацию липидного профиля крови пациентов уже на стадии начальных проявлений недостаточности кровоснабжения мозга.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hansson G. K. // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2001. – Vol.21, № 12. – P. 1876-1890.
2. Шмидт Е. В. // *Журн. невропатологии и психиатрии.* – 1985. – № 9. – С. 1281-1288.
3. Манвелов Л. С., Варакин Ю. Я., Смирнов В. Е. и др. // *Журн. неврологии и психиатрии им. Корсакова.* – 1998. – № 12. – С. 44-47.

### INDEX OF THE FUNCTIONAL ACTIVITY OF MONOCYTES IN EARLY FORMS OF CHRONIC BRAIN ISCHEMIA UNDER HYPERLIPIDEMIA

Davydova E. V.

*Medical University of South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russia*

The study of the functional activity of monocytes in early forms of chronic cerebral ischemia on the background of hyperlipidemia showed activation monocytopoiesis, increased adhesion, biocidal properties of the cells, an increase in the proliferative capacity of monocytes regardless of the nature of vascular disease, all of which contributes to the development of atherosclerosis and a prerequisite to the depletion of functionality monocytes in terms of progression of chronic brain ischemia.

*Key words:* early forms of chronic brain ischemia, hyperlipidemia, monocytes.

## ВЛИЯНИЕ ФИЗИЧЕСКОЙ НАГРУЗКИ РАЗЛИЧНОЙ ИНТЕНСИВНОСТИ НА УРОВЕНЬ ИНТЕРЛЕЙКИНОВ 6, 4

Ермолаева Е. Н.<sup>1</sup>, Кривохижина Л. В.<sup>1</sup>, Мезенцева Е. А.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ГОУ ВПО «Южно-Уральский государственный медицинский университет»  
Минздрава России; <sup>2</sup>НИИ иммунологии ЮУГМУ, Челябинск, Россия

Острая физическая нагрузка и хроническая нагрузка субмаксимальной мощности вызывает повышение в крови провоспалительного цитокина ИЛ-6, возрастание которого приводит к удовлетворению высоких энергетических требований. Постепенное повышение ИЛ-6 на правах тенденции при ХФН умеренной мощности, можно рассматривать как механизм адаптации к нагрузке. Повышение цитокина ИЛ-4 регистрируется лишь при хронической физической нагрузке субмаксимальной мощности на 21 сутки, что можно расценивать как фактор, способствующий устранению повреждений, вызванных интенсивной физической деятельностью.

*Ключевые слова:* интерлейкин-4, интерлейкин-6, физическая нагрузка.

Следствием чрезмерных физических нагрузок может быть повреждение из-за нарушений макро- и микрогемодинамики, формирования гипоксии, наличия синдрома ишемия-реперфузия, миграции лейкоцитов в работающие мышцы, нарастания катаболических процессов и другие. В ответ на лейкоцитарную реакцию и мышечную активность должна быть усилена продукция цитокинов, которые обладают мультифакторным действием: обеспечивают процессы межсистемного взаимодействия, отражают иммунный статус организма спортсмена и адаптацию к физическим нагрузкам. Требуется дополнения вопрос – зависит ли продукция цитокинов от интенсивности, длительности физической нагрузки и каково соотношение между про- и противовоспалительными цитокинами.

**Цель исследования** – в условиях эксперимента изучить изменение уровня ИЛ-6 и ИЛ-4 в крови при физических нагрузках различной интенсивности.

**Материалы и методы.** Исследование проведено на 54 белых беспородных крысах обоего пола массой 250-300 грамм. Все эксперименты выполнены согласно Европейской Конвенции по защите экспериментальных животных (Хельсинской декларации 1975 г. и ее пересмотра в 1983 г.). Исследуемые животные были разделены на контрольную группу (интактные крысы), опытные – животные, подвергавшиеся физической нагрузке разной интенсивности.

Одна группа животных подверглась острой физической нагрузке субмаксимальной мощности (ОФН), вторая – хронической физической нагрузке (ХФН) субмаксимальной мощности, третья – ХФН умеренной мощности. Модель острой физической нагрузки воспроизводилась по методу А.Ф. Краснова, Г.И. Самодановой и др. Животные плавали в течение 4-х минут с грузом массой 20% от веса тела. Температура воды – 32°C. Забор крови производился через 25 минут после плавания. ХФН субмаксимальной мощности моделировали ежедневным плаванием в течение 30 минут. Нагрузку увеличивали постепенно: первые семь дней животные ежедневно плавали без груза, следующие две недели животные плавали с грузом 2% от массы тела. На 9, 15 и 21 день эксперимента, животные подвергались дополнительно максимальной физической нагрузке: плавали в течение 4-х минут с грузом массой 20% от веса тела. ХФН умеренной мощности моделировали ежедневным плаванием в течение 30 минут. Забор крови производился на 9, 15 и 21 день эксперимента после физической нагрузки.

Интерлейкины 6 и 4 определяли иммуноферментным методом с помощью наборов реагентов Rat IL-6, Rat IL-4 фирмы «Platinum ELISA» (Австрия). Для определения достоверности различий средних величин применяли критерии непараметрической статистики Манна-Уитни (U); определяли основную тенденцию изменений (тренд) и коэффициент

аппроксимации для оценки силы влияния использовали однофакторный дисперсионный анализ.

**Результаты исследования и их обсуждение.** Уровень ИЛ-6 изменяется в зависимости от интенсивности физической нагрузки. При ОФН ИЛ-6 возрастает через 25 минут после мышечной активности относительно контроля на 70% ( $p < 0,01$  U). При ХФН субмаксимальной мощности регистрируется постепенное повышение уровня цитокина с начала эксперимента, что подтверждает тренд с коэффициентом аппроксимации  $R^2 = 0,93$ . Достоверное повышение ИЛ-6 отмечается на 42% – 15 суток ( $p < 0,028$  U) и на 84% – 21 сутки ( $p < 0,012$  U). При ХФН умеренной мощности постепенное повышение уровня ИЛ-6 наблюдается относительно контроля лишь на правах тенденции, но закономерность повышения подтверждается трендом и коэффициентом аппроксимации  $R^2 = 0,7859$ . В результате количественное значение ИЛ-6 не имеет достоверных различий с ХФН субмаксимальной мощности и занимает промежуточное положение между контролем и субмаксимальной нагрузкой. Однофакторный дисперсионный анализ доказал влияние ОФН и ХФН субмаксимальной мощности на уровень ИЛ-6: вклад ОФН составил в среднем 55,8% ( $p < 0,0058$ ), вклад ХФН субмаксимальной мощности 32,7% ( $p < 0,027$ ).

Возрастание ИЛ-4 на 17,4 ( $p < 0,025$  U) отмечается на 21 день эксперимента при ХФН субмаксимальной мощности. Иные виды физической нагрузки не привели к увеличению ИЛ-4.

Указывается, что при физической активности источником ИЛ-6 являются клетки скелетной мускулатуры секретирующие до 10–35% от его уровня в циркуляции [1]. Подтверждается, что секреция ИЛ-6 определяется интенсивностью нагрузки: у велосипедистов при умеренной нагрузке (40% максимального потребления кислорода) уровень ИЛ-6 практически не менялся, а при большей нагрузке (60% максимального потребления кислорода) спустя 3 часа езды на велосипеде он повышался в 2,5 раза. Обнаружено, что во время двигательной активности ИЛ-6 помимо воспалительной реакции участвует в других физиологических процессах. В печеночных и жировых клетках ИЛ-6 приводит к повышенному выделению носителей энергии: глюкозы и жирных кислот, а в клетках скелетной мускулатуры – к их усвоению и утилизации.

ИЛ-6 в мышечных клетках не только усиливает усвоение энергетического носителя, но и стимулирует оксидацию жирных кислот. По-видимому, метаболическое действие цитокина реализуется путем его воздействия на регуляторные внутриклеточные комплексы, а также за счет разнонаправленного изменения чувствительности к инсулину [2]. ИЛ-6 способствует также долгосрочной адаптации к физическим нагрузкам, которая заключается в новообразовании митохондрий и изменении состава мышечных волокон. Было высказано предположение, что именно ИЛ-6 является гипотетическим «фактором тренировки» [3].

Интерлейкин-4, представляет собой плейотропный цитокин, который играет важную роль в борьбе с воспалением. Основными производителями ИЛ-4 являются Т-клетки, тучные клетки и нейтрофилы. Было показано, что и другие клетки, такие как, мышечные клетки, гепатоциты, фибробласты способны продуцировать ИЛ-4. В ряде исследований было показано, что ИЛ-4, ИЛ-13, ИЛ-4RA и ИЛ-13Ra1 присутствуют в скелетных мышцах и увеличивают свою концентрацию после силовых тренировок [4]. Повреждения мышечных волокон становятся триггерами и запускают высвобождение противовоспалительных цитокинов. ИЛ-4 приводит к устранению повреждений мышц, вызванных физической нагрузкой. Последние исследования показывают, что ИЛ-4 способствует росту мышечных клеток, и что этот цитокин действует как промиграционный агент для миогенных клеток. При отсутствии ИЛ-4 или рецепторов к ИЛ-4 происходит снижение мышечной массы и количества ядер в мышечных клетках [5]. Таким образом, увеличение содержания ИЛ-4 после утомительной тренировки может быть важным для роста и восстановления мышечных волокон.

**Заключение.** Итак, острая физическая нагрузка и хроническая нагрузка субмаксимальной мощности вызывает повышение в крови провоспалительного цитокина ИЛ-6, возрастание которого приводит к удовлетворению высоких энергетических требований. Постепенное повышение ИЛ-6 на правах тенденции при ХФН умеренной мощности, можно рассматривать как механизм адаптации к нагрузке. Повышение цитокина ИЛ-4 регистрируется лишь при хронической физической нагрузке субмаксимальной мощности на 21 сутки, что

можно расценивать как фактор, способствующий устранению повреждений, вызванных интенсивной физической деятельностью.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Pedersen B.K. // Biochem. Soc. Trans.– 2007.– V. 35.– P. 1295-1297.
2. Febbraio M.A., Hiscock N., Sacchetti M. et al. // Diabetes.– 2004.– V. 53.– P. 1643-1648.
3. Weigert C., Schleicher E.D. // Diabetes und Stoffwechsel.– 2005.– V. 14.– P. 141-149.
4. Prokopchuk O., Liu Y., Wang L. et al.// Exerc Immunol Rev.– 2007.– V. 13.– P. 67-75.
5. Hoyer K.K., Doooms H., Barron L., Abbas A.K. // Immunol Rev.– 2008.– V. 226.– P. 19-28.

### INFLUENCE OF PHYSICAL ACTIVITY OF VARYING INTENSITY ON INTERLEUKIN 6, 4

<sup>1</sup>Ermolaeva E. N., <sup>1</sup>Krivohizhina L. V., <sup>2</sup>Mezentceva E. A.

<sup>1</sup>South Ural State Medical University, <sup>2</sup>Research Institute of Immunology South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russia

Acute and chronic exercise load submaximal power causes an increase in the blood of the proinflammatory cytokine IL-6, which gives rise to the satisfaction of the high energy requirements. Gradual increase of IL-6 on a trend at chronic moderate power exercise can be viewed as a mechanism of adaptation to the load. Increasing the cytokine IL-4 is recorded only in chronic physical load submaximal power for 21 hours, which can be considered as a factor contributing to the elimination of damage caused by intense physical activity.

*Keywords:* interleukin-4, interleukin-6, exercise.

### CTLA-4<sup>+</sup> И CD39<sup>+</sup> TREG-КЛЕТКИ У БОЛЬНЫХ ОСТРЫМ ПАНКРЕАТИТОМ

Жулай Г. А.<sup>1</sup>, Олейник Е. К.<sup>1</sup>, Олейник В. М.<sup>1</sup>, Кравченко П. Н.<sup>1</sup>,  
Чуров А. В.<sup>1</sup>, Островский К. А.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ФГБУН Институт биологии КарНЦ РАН; <sup>2</sup>НУЗ Отгеленческой клинической больницы на ст. Петрозаводск, Петрозаводск, Россия

В работе исследовано содержание периферических CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> Treg-клеток, а также CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>CTLA-4<sup>+</sup> и CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>CD39<sup>+</sup> Treg-клеток у больных острым панкреатитом (ОП, n=16) и у здоровых доноров (контроль, n=20). Было показано, что у больных ОП количество этих клеток увеличено по сравнению с контролем. Также обнаружены изменения в экспрессии молекул CTLA-4 и CD39 у больных ОП для клеток с фенотипом CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>lo</sup>.

*Ключевые слова:* острый панкреатит, Treg-клетки, CTLA-4, CD39.

**Актуальность и цель работы.** Острый панкреатит (ОП) – воспалительное заболевание, связанное с повреждением поджелудочной железы, осложнениями которого может быть развитие панкреонекроза, появление инфекции или сепсиса и формирование полиорганной функциональной недостаточности [1]. В настоящее время, несмотря на по-

явление новых методов лечения, смертность от тяжелых форм этого заболевания остается высокой [2]. Последние исследования демонстрируют, что развитие ОП тесно связано с дисбалансом в функционировании иммунной системы и одним из перспективных направлений в лечении больных ОП является применение иммуномодуляторов [3]. Однако

для успешной и эффективной иммунной коррекции необходимо понимание механизмов развития иммунной супрессии у больных ОП. В этом отношении особый интерес представляет популяция регуляторных Т-лимфоцитов (Treg), основной функцией которых является супрессия чрезмерного иммунного ответа [4]. Для подавления активации и пролиферации клеток-мишеней Treg-клетки используют широкий круг механизмов, включающих как контакт-зависимую супрессию, так и супрессию, опосредованную различными ингибиторными факторами (IL-10, TGF- $\beta$ , гранзимы, с-АМФ и др.). Treg-клетки характеризуются высокой конститутивной экспрессией молекулы CD25 ( $\alpha$ -цепь рецептора интерлейкина (IL)-2) и пониженной экспрессией молекулы CD127 ( $\alpha$ -цепь рецептора IL-7). Для их идентификации используют и молекулу FOXP3 – транскрипционный фактор, который отвечает за развитие популяции и их супрессорную функцию [4]. Целью работы была оценка роли молекул CTLA-4 (антиген 4 цитотоксических лимфоцитов) и CD39 (эктонуклеозид трифосфат дифосфогидролазы-1), экспрессируемых Treg-клетками у больных острым панкреатитом. Благодаря экспрессии эктонуклеотидазы CD39 Treg-клетки могут участвовать в генерации внеклеточного аденозина, который ингибирует пролиферацию иммунных клеток и продукцию ими цитокинов. CTLA-4 является негативной регуляторной молекулой, которая снижает активацию клеток-мишеней, препятствует дальнейшей пролиферации и функционированию [4].

**Материалы и методы.** В работе исследовано 16 образцов периферической крови больных ОП. Диагноз был поставлен на основе классификации, принятой на IX Всероссийском съезде хирургов в 2000 году. Среди обследованных 7 человек имели деструктивную форму ОП. Средний возраст больных составил  $44,8 \pm 17,0$  лет. Забор крови осуществляли на 1-10 сутки после поступления на лечение, до оперативного вмешательства. В качестве контроля были проанализированы 20 образцов крови здоровых доноров, сопоставимых по возрасту. Оценку содержания популяций лимфоцитов проводили методом многоцветной проточной цитометрии. Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета программ Statistica 6.0, достоверность различий между группами рассчиты-

вали по критерию Манна-Уитни при уровне значимости  $p < 0,05$ .

**Результаты.** Ранее нами было обнаружено повышенное содержание CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup> и CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>lo</sup> Treg-клеток в крови больных ОП по сравнению со здоровыми донорами [5]. В данной работе для определения Treg-клеток рассматривали более специфический фенотип CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> [4]. В результате анализа показано, что у больных ОП количество CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> было выше ( $p < 0,0001$ ) и составило  $7,79 \pm 2,1\%$  от CD4<sup>+</sup> Т-клеток, в то время как в контроле содержание Treg-клеток было  $3,31 \pm 1\%$ . Также у больных ОП существует положительная корреляция между числом CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> и CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>lo</sup> Т-клеток ( $r = 0,89$ ,  $p < 0,01$ ).

При анализе содержания CD4<sup>+</sup> Т-клеток, экспрессирующих молекулу CTLA-4, отмечено, что у больных ОП повышено число как CD4<sup>+</sup>CTLA-4<sup>+</sup> Т-клеток ( $p < 0,05$ ), так и CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>CTLA-4<sup>+</sup> Treg-клеток ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем (ОП:  $10,7 \pm 5,1\%$  и  $4,79 \pm 2,5\%$ ; контроль:  $7,68 \pm 1,8\%$  и  $2,52 \pm 0,9\%$  от CD4<sup>+</sup> Т-клеток). Далее мы оценили уровень экспрессии CTLA-4 в CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> Т-хелперах, активированных CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Т-клетках и CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>lo</sup> Treg-клетках. Увеличение экспрессии CTLA-4 было отмечено у больных ОП для фенотипа CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>lo</sup> по сравнению с контролем ( $59,41 \pm 11,3\%$  и  $43,37 \pm 4,4\%$ ,  $p < 0,0001$ ), тогда как для других рассматриваемых фенотипов уровень экспрессии этой ингибиторной молекулы не отличался от контроля. Вероятно, увеличение числа CD4<sup>+</sup> Т-хелперов, экспрессирующих CTLA-4, наблюдаемое нами в периферической крови больных ОП было связано с усилением экспрессии CTLA-4 Treg-клетками и повышенным содержанием CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>CTLA-4<sup>+</sup> Т-клеток. Также у больных ОП была обнаружена высокая положительная корреляция количества клеток с фенотипами CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>CTLA-4<sup>+</sup> и CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> ( $r = 0,93$ ,  $p < 0,01$ ).

При анализе содержания CD4<sup>+</sup> Т-клеток, экспрессирующих эктонуклеотидазу CD39, было показано, что число CD4<sup>+</sup>CD39<sup>+</sup> Т-клеток у больных ОП было на уровне контроля, тогда как количество CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>CD39<sup>+</sup> Treg-клеток в крови больных ОП было в 2 раза выше, чем в контроле ( $4,21 \pm 2,5\%$  и  $2,0 \pm 1\%$  от CD4<sup>+</sup> Т-клеток,  $p < 0,001$ ). Уровень экспрессии молекулы CD39 также оценивали в клетках с фенотипами CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>



и CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>lo</sup>. Изменения в экспрессии этой молекулы среди данных фенотипов были обнаружены только для CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>lo</sup> Treg-клеток, для которых показана повышенная экспрессия уровня CD39 у больных ОП по сравнению с контролем (62,94±17,8% и 39,43±15,6%, p<0,01).

**Заключение.** Результаты нашего исследования, а также литературные данные демонстрируют увеличение содержания периферических CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>, а также CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup> и CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>lo</sup> Treg-клеток при развитии ОП [2,5]. Кроме того, мы показали, что у таких больных происходит усиление функционирования Treg-клеток в отношении экспрессии ингибиторной молекулы CTLA-4 и эктонуклеотидазы CD39, участвующей в генерации иммуносупрессорного аденозина. У больных ОП активация популяции Treg-клеток может играть защитную роль для клеток и тканей организма, ограничивая развитие воспаления. Однако чрезмерная супрессия иммунного от-

вета может привести к снижению устойчивости организма к развитию инфекции, что может вызывать осложнения течения заболевания. В связи с этим необходимо дальнейшее исследование природы и механизмов иммунных нарушений у больных ОП.

Финансовое обеспечение исследований осуществлялось из средств федерального бюджета на выполнение государственного задания № 0221-2014-0011, а также при поддержке РФФИ (№ 13-04-98826).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Mofleh Al I.A. World J Gastroenterol 2008, 14, 675-684.
2. Li J.P., Yang J., Huang J.R. et al. Front Biosci 2013, 18, 892-900.
3. Zhang X.P., Chen H.Q., Liu F., Zhang J. J Zhejiang Univ Sci B 2009, 10, 493-498.
4. Sakaguchi S., Miyara M., Costantino C.M., Haffner D.A. Nat Rev Immunol 2010, 10, 490-500.
5. Жулай Г.А., Олейник Е.К. и др. ЭИКТ 2014, 109, 21-25.

#### CTLA-4<sup>+</sup> AND CD39<sup>+</sup> TREG-CELLS IN PATIENTS WITH ACUTE PANCREATITIS

Zhulai G.A.<sup>1</sup>, Oleinik E.K.<sup>1</sup>, Oleinik V.M.<sup>1</sup>, Kravchenko P.N.<sup>1</sup>,  
Churov A.V.<sup>1</sup>, Ostrovskii K.A.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>IB KarRC RAS; <sup>2</sup>Department of clinical hospital at the station Petrozavodsk, Petrozavodsk, Russia

The frequency of peripheral CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>CTLA-4<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>CD39<sup>+</sup> Treg cells was investigated in patients with acute pancreatitis (AP, n=16) and healthy donors (control, n=20). We shown that in patients with AP amount of these cells increased in comparison with the control. Changes in CTLA-4 and CD39 expression in patients were found for phenotype CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>lo</sup>.

## ЖЕЛЕЗОСВЯЗЫВАЮЩИЕ БЕЛКИ, ИХ СЕЗОННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ И СВЯЗИ С МЕТАБОЛИЗМОМ НЕЙТРОФИЛОВ У СТУДЕНТОВ-СПОРТСМЕНОВ

Зайцева И. П.<sup>1, 2</sup>, Романов В. А.<sup>2</sup>

*1ГБОУ ВПО «Ярославский государственный университет им П. Г. Демидова»;*

*2ГБОУ ВПО Ярославский государственный медицинский университет*

*Минздрава России, Ярославль, Россия*

Установлено более высокое содержание железосвязывающих белков (лактоферрина, ферритина) у мужчин-студентов, чем у женщин, трансферрина – более низкие. Высокие физические нагрузки у студентов-спортсменов (атлеты, баскетболистки) снижали уровни Лф и Фр на фоне увеличения Тф и продукции активных форм кислорода нейтрофилами. Наименьшие показатели Лф и Фр выявлены весной, наибольшие – летом или осенью с последующим снижением зимой. Установлена корреляционная связь между содержанием железосвязывающих белков и продукцией активных форм кислорода.

*Ключевые слова:* железосвязывающие белки, сезоны, нейтрофилы, студенты-спортсмены.

**Актуальность.** Железосвязывающие белки организма (ферритин – Фр, лактоферрин – Лф, трансферрин – Тф) отражают запасы железа в организме и выполняют важные защитные функции. Лф, связывая необходимые для жизнедеятельности бактерий ионы железа, активирует кислородзависимый метаболизм нейтрофилов – важный фактор антибактериального иммунитета. Тф, транспортный белок, регулирует транспорт и метаболизм белков, способствуя развитию воспаления. Дисбаланс в системе железосвязывающих белков и метаболизма железа отрицательно влияет на состояние организма, функций ряда органов и тканей. Данные литературы свидетельствуют о том, что интенсивные тренировки у спортсменов высокой квалификации приводят к снижению уровня железа в организме [2, 4], повышая риск возникновения железодефицитной анемии и инфекционных осложнений [3]. В связи с этим вопрос о контроле за уровнем железа и состоянии иммунной системы, по данным определения железосвязывающих белков, в различные периоды подготовки профессиональных спортсменов приобретает важное научно-практическое значение. Некоторыми авторами продемонстрированы сезонные изменения в иммунной системе у студентов в зависимости от уровня их физической тренированности [1], однако

применительно к железосвязывающим белкам у студентов-спортсменов подобные работы не проводились.

**Цель работы.** Изучение уровней сывороточных Фр, Лф и Тф, показателей кислородзависимого метаболизма нейтрофилов (Нф) и их взаимосвязей у студентов-спортсменов в зависимости от уровня физических нагрузок, пола, сезонов года.

**Используемые методы.** Обследовано 22 студента-спортсменов, занимающихся борьбой самбо в группе новичков, 23 студента, тренирующихся по программе мастеров, у 18 студенток, тренирующихся в секции баскетбола и у 18 студенток, занимающихся фитнес-аэробикой в группе новичков. Группа студентов, не занимающихся спортом систематически, состояла из 33 лиц мужского пола и 33 женского; группа сравнения была представлена 22 женщинами и 22 мужчинами, не являющимися студентами и спортсменами. Содержание Фр, Лф и Тф в сыворотке крови обследованных лиц определяли методом иммуноферментного анализа, кислородзависимый метаболизм нейтрофилов – методом спонтанной и индуцированной хемилюминесценции (сХЛ, иХЛ). Результаты исследований обработаны с помощью программы STATISTICA (StatSoft, Inc.) релиз 10.0.

**Основные результаты.** Установлено, что у мужчин-студентов и неучащихся мужчин, не занимающихся спортом, содержание Фр ( $158 \pm 27$ ,  $232 \pm 31$  нг/мл) и Лф ( $661 \pm 686$ ,  $744 \pm 41$  нг/мл) было достоверно выше, чем в аналогичных группах у женщин (Фр –  $112 \pm 13$ ,  $124 \pm 13$  нг/мл), (Лф –  $531 \pm 31$ ,  $631 \pm 58$  нг/мл), тогда как уровни Тф в тех же группах ( $2,16$ ;  $2,08$  г/л) были выше у женщин ( $2,34$ ,  $2,55$  г/л).

Аналогичные изменения в содержании железосвязывающих белков (более низкие показатели Фр, Лф, более высокие – Тф у женщин, чем у мужчин) в зависимости от пола были констатированы и в группах студентов, занимающихся спортом.

Так, высокие физические нагрузки у студентов самбистов мастеров спорта сопровождалась достоверным уменьшением уровней Лф ( $445 \pm 68$  нг/мл) и Фр ( $144 \pm 27$  нг/мл) на фоне достоверного повышения Тф до  $2,14$  г/л по сравнению с данными в группах самбистов-новичков и лиц мужского пола контрольных групп. У женщин-баскетболисток отмечались более низкие концентрации Лф ( $453 \pm 27$  нг/мл), Фр ( $84 \pm 32$  нг/мл) и более высокие – Тф (до  $2,36 \pm 0,09$  г/л) по сравнению с аналогичными показателями студенток, занимающихся фитнес-аэробикой – Лф ( $590 \pm 86$  нг/мл), Фр ( $114 \pm 31$  нг/мл) и более высокие – Тф (до  $2,56 \pm 0,14$  г/л), а также представительниц контрольных групп.

Детальный анализ результатов исследования в зависимости от времени года показал, что достоверно наименьшие показатели Лф и Фр во всех группах были обнаружены весной, наибольшие – летом или осенью с последующим снижением зимой, независимо от уровня физических нагрузок.

Кислородзависимый метаболизм нейтрофилов ( $1,09 \pm 0,12$  имп/мин) у студентов в сравнении с аналогичными показателями неучащейся молодежи был значительно снижен ( $2,0 \pm 0,19$  имп/мин  $p < 0,05$ ). Более высокие показатели сХЛ и более низкие – иХЛ были у женщин, чем у мужчин ( $p < 0,05$ ). У нетренированных студентов показатели окислительного стресса нейтрофилов были ниже, чем у студентов-спортсменов высокой квалификации во всех группах независимо от пола ( $P < 0,001$ ). У исследованных лиц всех групп показатели сХЛ и иХЛ были наиболее высокими осенью, достоверно уменьшаясь зимой и, особенно весной, с последующим увеличением летом, при

этом у студентов во все сезоны они были значительно ниже, чем в контрольной группе неучащихся лиц ( $P < 0,001$ ). Установлены прямые корреляционные связи между спонтанной продукцией активных форм кислорода в тесте сХЛ и Фр ( $r = 0,34$ ,  $p < 0,05$ ).

Выполненные исследования свидетельствуют о зависимости содержания железосвязывающих белков и кислородзависимых функций Нф от пола и уровня физических нагрузок у студентов-спортсменов. Низкие уровни Фр и Лф на фоне увеличения Тф, констатированное у женщин, свидетельствует о возможности развития железодефицитных анемий и возможных отклонений в иммунном статусе, затрагивающих систему антибактериального иммунитета, особенно в фагоцитарном звене. Это подтверждается данными корреляционного анализа о взаимосвязи ферритина с продукцией активных форм кислорода нейтрофилами. Такие риски возникают также при высоких спортивных нагрузках, в частности, у студентов мастеров спорта по самбо, а также у спортсменок-баскетболисток.

Следует также учесть высокие стрессовые нагрузки у студентов в процессе обучения в вузе, в ряде случаев неупорядоченность питания у студентов, что создает предпосылки к возникновению дефицита железа в организме и как следствие этого риск развития железодефицитной анемии и несостоятельности иммунитета. Факт нехватки железа и изменений в иммунной системе при интенсивных физических нагрузках у студентов-спортсменов определяет актуальность мониторинга содержания железа, в том числе по уровням железосвязывающих белков. Сезонность содержания этих протеинов (наименьшие показатели весной) диктует необходимость коррекции дефицита железа, особенно у женщин и студентов-спортсменов с высокой спортивной квалификацией.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Зайцева И. П., Романов В. А. Вестн. Уральской медицинской академической науки. – 2011. – № 2/2, (35). – С. 88-89.
2. Ahmadi A., et al. Pak. J. Biol. Sci. – 2010. – Jan. – 15; – 13 (2). – P. 93-96.
3. DellaValle D.M., Haas J.D. Int. J. Sport Nutr. Exerc. Metab. – 2011. – Dec. – 21 (6). – P. 501-506.
4. Reinke S. et al. Int. J. Cardiol. – 2012. – Apr 19. – 0156 (2. – P. 186-191.

## Fe-BINDING PROTEINS, THEIR SEASONAL CHANGES AND THE METABOLISM OF NEUTROPHILS AMONG STUDENT-ATHLETES

Zaitseva I. P.<sup>1</sup>, Romanov V. A.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>State University; <sup>2</sup>State Medical University, Yaroslavl, Russia

Has a higher content of Fe-binding proteins (lactoferrin and ferritin,) for men than for women, students, transferrin-lower. High physical exertion (athletes, basketball players) reduced the levels of Lf and Rf on the background of increasing Tf and reactive oxygen species production by neutrophils. Lowest Lf and Rf are revealed in spring, summer or fall-the most followed by the declining winter. Detected a correlation between the content of Fe-binding proteins and the production of reactive oxygen species.

*Key words:* Fe-binding proteins, seasons, neutrophils, the students-athletes.

## НАПРЯЖЕННОСТЬ И ДЛИТЕЛЬНОСТЬ КОРЕВОГО И ПАРОТИТНОГО ПОСТПРИВИВОЧНОГО ИММУНИТЕТА У ДЕТЕЙ

Злакоманова О. Н.<sup>1</sup>, Москвичева М. Г.<sup>1</sup>, Попов Е. А.<sup>1</sup>,  
Никушкина К. В.<sup>1</sup>, Полетаева М. А.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ГБОУ ВПО Южно-Уральский государственный медицинский университет Минздрава России; <sup>2</sup>МГК ГБУЗ «Областной перинатальный центр», Челябинск, Россия

Исследованы напряженность поствакцинального иммунитета (ответчаемость, защищенность) на коревую и паротитную вакцины через год после вакцинации и ревакцинации против кори и эпидемического паротита. Зарегистрированы высокие проценты серонегативных по кори и паротиту детей и низкие показатели защищенности, как после вакцинации, так и после ревакцинации против данных инфекций. Выявленные изменения показателей клеточного и гуморального иммунитета являются условием, препятствующим формированию иммунологической памяти, пролонгирующей интенсивность поствакцинального антителообразования.

*Ключевые слова:* корь, паротит, вакцинация, дети.

Актуальность проблемы вакцинопрофилактики управляемых инфекций у детей обусловлена тем, что около 64% летальных исходов у детей обусловлено инфекционными заболеваниями. При этом на долю столбняка, кори, коклюша приходится 13, 5 и 7% соответственно. Основной причиной младенческой смертности являются инфекции. По данным ВОЗ первичные инфекции в структуре младенческой смертности составляют 36%. В Российской Федерации более 600 тысяч детей-инвалидов (12,3% от общего числа) и у каждого третьего ребенка инвалидность формируется в результате тяжелого течения инфекционного заболевания.

Длительный опыт вакцинопрофилактики кори и эпидемического паротита свидетельствует, что стойкое снижение заболеваемости обеими инфекциями обусловлено постоянным

увеличением охвата прививками детей декретированного возраста. Многочисленные исследования, посвященные вакцинопрофилактике, направлены на то, чтобы сделать её максимально безопасной и, в то же время, эффективной [3]. Если безопасность вакцинации определяется отсутствием поствакцинальных осложнений, то иммуногенность – с процентом защищённых и интенсивностью антителообразования.

**Цель исследования** – определить напряженность поствакцинального иммунитета (ответчаемость, защищенность) у детей через год после вакцинации и ревакцинации против кори и эпидемического паротита.

**Материалы и методы.** На базе МБУЗ ДГКП № 8 г. Челябинска были обследованы 86 детей в возрасте от 2 до 5 лет, посещающие детские дошкольные образовательные учреждения

и 62 пациента в возрасте от 6 до 8 лет, посещающие школу. Информированное согласие родителей на проведение иммунологического исследования у детей получено.

Вакцинальный статус: все 100% детей вакцинированы в соответствии с Национальным календарем. Охват прививками анализировали на основании истории развития ребенка или амбулаторной карты. Оценивая качество иммунопрофилактики были проведены серологические исследования, включающие определение в сыворотке крови АТ к кори, паротиту через год после вакцинации и ревакцинации. Интерпретация результатов осуществлялась в соответствии с Методическими указаниями МУ 3.1.1760-03 «Организация и проведение серологического мониторинга состояния коллективного иммунитета против управляемых инфекций (дифтерия, столбняк, корь, краснуха, эпидемический паротит, полиомиелит)».

Рассчитывался показатель защищенности (З) – это процентное соотношение числа детей, в сыворотке которых антитела обнаруживаются в защитных титрах и выше (А) / к числу детей, идеально (или почти идеально) привитых против данной инфекции (В):  $Z = (A/B) \times 100$ . Для выяснения вероятных причин слабого иммунного ответа были проведены исследования иммунного статуса у детей, не отреагировавших на вакцинацию (серонегативная прослойка). В качестве контрольной группы служили дети, адекватно ответивших на введение вакцин.

Исследование клеточного иммунитета включало: Т-лимфоциты (CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> -клетки), активированные Т-лимфоциты (CD3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>-клетки) Т-киллеры (CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> клетки), В-лимфоциты (CD3<sup>-</sup>CD19<sup>+</sup>), естественные киллеры (CD3<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>). Субпопуляции лимфоцитов определяли методом проточной цитофлюориметрии с использованием моноклональных антител фирмы (Beckman Coulter, USA), иммуноглобулинов (А, М, G), фагоцитарной активности нейтрофилов (активность, интенсивность фагоцитоза нейтрофилов, фагоцитарный индекс), активность кислородозависимых метаболических процессов нейтрофилов (НСТ-тест). Полученные данные обработаны с помощью пакета прикладных программ SPSS Statistics v.19.

**Результаты исследований.** Предыдущими нашими исследованиями показано, что, несмотря на высокий уровень охвата иммунизацией детей декретированных возрастов

(88,5%), не у всех присутствует напряженный поствакцинальный иммунитет [1].

Работами Россошанской [2] при тестировании сывороток у детей раннего возраста, установлено, что только 44% детей первого года жизни оказались защищенными от кори и 52% от эпидемического паротита.

При определении уровня напряженности противокорревого иммунитета у детей через год после вакцинации было выделено три группы. В группу с высокими титрами противокорревых АТ вошли 24 ребенка, что составило 27,9%. Средняя концентрация защитных антител –  $3,05 \pm 0,15$  МЕ/мл, что может обеспечить данным пациентам долговременную противовирусную защиту. Вторую группу составили 38 детей (44,2%) со средними показателями противокорревых антител  $1,365 \pm 0,05$  МЕ/мл, которым был рекомендован повторный серологический контроль. В третью группу вошли 24 (27,9%) серонегативных пациента, не ответивших на введение противокорревой вакцины, у которых регистрировался уровень АТ –  $0,47 \pm 0,05$  МЕ/мл. Показатель защищенности по кори составил 72,1%.

Оценивая отвечаемость и защищенность вакцинированных против эпидемического паротита детей, также было выделено три группы. Высокие титры противопаротитных АТ определялись у 28 детей (32,56%), со средним уровнем  $145,73 \pm 7,56$  RU/мл. Вторая группа – 42 ребенка (48,84%) с показателями противопаротитных Ig G  $62,07 \pm 2,99$  RU/мл. 16 детей (18,6%) не ответили на введение паротитной вакцины, концентрация Ig G к вирусу эпидемического паротита у них не превышала  $12,96 \pm 7,56$  RU/мл. Показатель защищенности по паротитной инфекции – 81,4%.

Мы сочли целесообразным проанализировать результаты специфического антителообразования к другим инфекциям ([1]) у серонегативных по кори и эпидемическому паротиту детей. Анализ показал, что через год после вакцинации уровни антител к дифтерийному и столбнячному анатоксину были сопоставимы с таковыми у детей, эффективно ответивших на коревую вакцину. Концентрации IgG к коклюшному анатоксину и к вирусу эпидемического паротита были достоверно ниже, чем аналогичные показатели у детей группы сравнения. У серонегативных по паротиту детей регистрировались достоверно более низкие титры АТ к коревому вирусу, столб-

нячному и дифтерийному анатоксином, чем такие же параметры пациентов контрольной группы. Уровни АТ к коклюшному анатоксину были соизмеримы с таковыми у детей, эффективно ответивших на паротную вакцину.

Спустя год после ревакцинации кори и паротита количество серонегативных по кори детей составило 17,74%, показатель защищенности – 82,3%. Однако, несмотря на более высокую защищенность по кори после ревакцинации и меньшее количество серонегативных по кори пациентов, регистрировалось снижение интенсивности специфического антителообразования. Титры IgG к дифтерии, столбняку, коклюшу и паротиту достоверно ниже, чем у детей, эффективно ответивших на ревакцинацию кори. Кроме того, количество детей, у которых вырабатывались высокие титры IgG к кори и эпидемическому паротиту уменьшилось с 27,9% до 9,7% и с 32,6% до 24,2% соответственно.

Результаты исследований клеточного и гуморального звеньев иммунитета свидетельствуют о том, что у не отреагировавших на стандартную схему введения коревой и паротитной вакцины наблюдалась иммуносупрессорная направленность иммунных сдвигов. Снижено по сравнению с контролем содержание CD4<sup>+</sup> клеток (Т-хелперы), активированных лимфоцитов CD25<sup>+</sup> и Т-лимфоцитов, экспрессирующих HLA-DR (поздняя активация). Выявлен дефицит CD16<sup>+</sup> (NK)-клеток, стимулирующих Th1-противовирусный иммунный ответ и активацию практически всех клеток врожденного и адаптивного иммунитета. Можно предположить, что у данных детей произошла не только утрата противокоревых и противопаротитных АТ, но и клеток памяти. В связи с этим, выработка иммунитета при вакцинации происходит по первичному пути через образование IgM,

концентрация которых достоверно повышена, а образование антител класса IgG запаздывает или, у некоторых детей, блокировано (достоверное снижение по сравнению с контролем).

Таким образом, снижение числа основных субпопуляций лимфоцитов, ответственных за развитие противовирусного иммунитета (CD4<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup>), являются условием препятствующим формированию иммунологической памяти, пролонгирующей интенсивность поствакцинального антителообразования.

В заключение хотелось бы сказать, что в медицинской практике пока нет условий для определения уровня антител у всех вакцинированных детей, хотя серологический мониторинг широко применяется для оценки коллективного иммунитета.

В идеале важно знать потенциальную способность каждого ребенка формировать иммунитет против возбудителей конкретных инфекций еще до проведения вакцинации. В этой связи уместным будет привести высказывание основоположника вакцинологии – Эдварда Дженнера, о том, что «... Знакомство лишь в общих чертах с манипуляцией вакцинации далеко недостаточно, чтобы сделать врача способным выполнить прививание; врач должен обладать точным знанием его, и я настаиваю на этом».

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Попов Е. А., Злакоманова О. Н., Москвичева М. Г., Мезенцева Е. А. – Российский иммунологический журнал. – 2014. – Т. 8 (17). – № 2 (1). – С. 132-135.
2. Россошанская Н. В. автореф. дис. ... канд. мед. наук, Москва, 2006. – 24 с.
3. Харит С. М., Черняева Т. В., Началова Е. П., Голева О. В. – Педиатрическая фармакология. – 2014. – Т. 4. – № 6. – С. 28-33.

## INTENSITY AND DURATION OF POST-VACCINATION IMMUNITY AGAINST MEASLES AND MUMPS OF CHILDREN

Zlakomanova O. N.<sup>1</sup>, Moskvicheva M. G.<sup>1</sup>, Popov E. A.<sup>1</sup>,  
Nikushkina K. V.<sup>1</sup>, Poletaeva M. A.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>GBOU VPO South Ural State Medical Universiti of Health of Russia; <sup>2</sup>MGK GBUS  
«Regional the perinatal center», Chelyabinsk, Russia

Investigate intensity of post-vaccination immunity (responsiveness, protection) for measles and mumps vaccine one year after vaccination and revaccination against measles and mumps. Registered high share seronegative for measles and mumps children and low index of protection, as after vaccination and after revaccination against these infections. Revealed changes in cellular and humoral immunity are conditions preventing the formation of immunological memory, prolong the intensity of post-vaccination antibody.

*Key words:* vaccination, measles and mumps, children.

## ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ РАЗЛИЧНЫХ КОМБИНАЦИЙ СИНТЕТИЧЕСКИХ ПЕПТИДОВ АКТИВНОГО ЦЕНТРА ГМ-КСФ И БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ (ДЕФЕНСИНОВ, ЛИЗОЦИМА, ИНТЕРЦИДА, СУПЕРНАТАНТОВ КЛЕТОК CD34<sup>+</sup>) НА АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫЕ, ИММУНОТРОПНЫЕ И РЕПАРАЦИОННЫЕ СВОЙСТВА

Зурочка В. А.<sup>1,3</sup>, Зурочка А. В.<sup>1,3</sup>, Добрынина М. А.<sup>1</sup>,  
Зуева Е. Б.<sup>1</sup>, Гриценко В. А.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ФГБУН Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения РАН, Екатеринбург; <sup>2</sup>ФГБУН Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения РАН, Оренбург; <sup>3</sup>ГБОУ ВПО «Южно-Уральский государственный университет» (национальный исследовательский университет), Челябинск, Россия

Изучали антибактериальное, иммуностимулирующее и репаративное действие синтетических пептидов активного центра ГМ-КСФ и комбинаций препарата с различными биологически активными веществами. Было выявлено, что пептиды ГМ-КСФ интерцид, лизоцим и супернатанты клеток CD34<sup>+</sup> обладают выраженной антибактериальной активностью, при этом комбинация данных веществ обладает более выраженной активностью по сравнению с отдельными веществами, при этом эти вещества влияют как на рост, размножение бактерий, так и на их биопленкообразование. Одновременно синтетические пептиды и их комбинации с биологически активными веществами обладают иммуностимулирующей и репаративной активностью. Обсуждаются возможные механизмы выявленных эффектов синтетических пептидов и их комбинаций с другими биологически активными веществами.

**Ключевые слова:** пептиды ГМ-КСФ, клетки CD34<sup>+</sup>45<sup>-</sup>, антибактериальная, иммуностимулирующая и репаративная активность.

**Введение.** Получение новых химических пептидных соединений, обладающих антимикробной активностью, является одной из приоритетных задач современной микробиологии и иммунологии. При этом очень важно знать, обладают ли эти препараты дополнительными свойствами, и спектр их активности. Ранее нами было показано, что пептиды ГМ-КСФ обладают иммуностимулирующей активностью [1, 2, 3, 4]. Именно дальнейшему изучению данных и выявлению новых свойств посвящено настоящее исследование.

**Целью исследования** явилось изучение антибактериальных, иммуностимулирующих и репаративных свойств синтетических пептидов активного центра ГМ-КСФ и супернатантов CD34<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup> клеток-предшественников гемопоэза.

Было продолжено исследование различных эффектов синтетических пептидов на различных моделях. Антибактериальную активность синтетических пептидов, фракций суперна-

тантов клеток периферической крови, различных дефенсинов (лизоцим, интерцид, Zp1, Zp2, LL37, HNP, супернатанты клеток CD34<sup>+</sup>45<sup>-</sup>) изучали на модели бактерицидной активности, которую оценивали по общепринятой методике «Определение чувствительности микробов к антибиотикам методом диффузии в агар с применением бумажных дисков», кроме того, изучали влияние пептидов и их комбинаций с веществами на биопленкообразование Gr<sup>+</sup> и Gr<sup>-</sup> бактерий, а иммуностимулирующую активность изучали на модели РБТЛ *in vitro*, репаративную – на модели кожной раны в эксперименте.

Исследования показали, что полученные синтетические пептиды ZP1 (химическая формула -LYS GLY PRO LEY THR NLE NLE ALA SER HIS TYR LYS GLN HIS CYS PRO) и ZP2 (химическая формула -THR NLE NLE ALA SER HIS TYR LYS GLN HIS CYS PRO), помимо основного эффекта (стимуляция костномозгового кроветворения), обладают рядом вы-

раженных дополнительных свойств, а именно: антибактериальной активностью в отношении Грамотрицательных и Грамположительных бактерий, сравнимых с известными стандартными дефенсинами и другими веществами, обладающими подобными свойствами. Важно отметить, что при комбинировании пептида из активного центра ГМ-КСФ с веществами, полученными из супернатантов CD34<sup>+</sup>45<sup>-</sup> клеток – предшественников гемопоэза их антибактериальная активность значительно (более чем в 100 раз) возрастает, так же возрастает их активность при комбинации с интерцидом и лизоцимом. При этом пептид и комбинации пептида с другими веществами влияют не только на рост и размножение бактерий, но и на биопленкообразование микроорганизмов. Эти же пептиды и их комбинации в таких же дозах обладали выраженным репаративным действием и стимулировали лимфоциты в РБТЛ *in vitro* и изменяли дифференцировку фетальных клеток. Одновременно пептиды ГМ-КСФ и их комбинации с интерцидом, лизоцимом и супернатантами CD34<sup>+</sup> клетками обладают выраженным репаративным действием.

Полученные данные свидетельствуют не только о новых свойствах синтетических пептидов ГМ-КСФ, но и расширяют наши представления о возможных механизмах действия данных синтетических соединений.

На основе синтетического пептида активного центра ГМ-КСФ созданы косметические

средства Ацеграм – гель и Ацеграм – спрей, применение которых в клинической практике выявило выраженное репаративное действие данных препаратов при заживлении постоперационного повреждения шейки матки (после электроэксцизионной процедуры иссечения очагов повреждения при ЦИН-1 и ЦИН-2). При этом резко (до 7–10 раз) снижались сроки заживления ран и быстрее восстанавливался микробиоценоз влагалища у женщин. Применение препарата Ацеграм для восстановления косметического дефекта при диабетических язвах, пролежнях, раневых процессах, для заживления после операционных швов также выявило его высокую эффективность. Все это расширяет спектр применения препаратов на основе синтетического пептидного активного центра ГМ-КСФ для клинической практики.

Исследования поддержаны грантом РФФИ 11-04-97102-р\_поволжье\_а, государственным контрактом № 02.512.11.2324, грантом УрО РАН 12-У-4-1030.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Жемчугов В. Е., Зурочка А. В., Румянцев А. Г. Патент № 2136308 от 10.09.1999.
2. Зурочка А. В., Суховой Ю. Г., Зурочка В. А. и др. Патент. № 2465001 от 27.10.2012.
3. Зурочка А. В., Зурочка В. А., Костоломова Е. Г. и др. // Цитокины и воспаление. – С. – Петербург, 2012, Т. 11. – № 2. – С. 96-99
4. Зурочка В. А., Зурочка А. В., Костоломова Е. Г. и др. // Цитокины и воспаление. – С. – Петербург, 2012, Т. 11. – № 4. – С. 21-25

#### ASSESSMENT OF INFLUENCE OF VARIOUS COMBINATIONS OF SYNTHETIC PEPTIDES OF THE GM-KSF ACTIVE CENTER AND BIOLOGICALLY ACTIVE AGENTS (DEFENSINS, LYSOZYME, INTERCEED, SUPERNATANTS OF CD34<sup>+</sup> CELLS) ON ANTIBACTERIAL, IMMUNOTROPIC AND REPARATION PROPERTIES

Zurochka V. A.<sup>1,3</sup>, Zurochka A. V.<sup>1,3</sup>, Dobrynina M. A.<sup>1</sup>,  
Zuyeva E. B.<sup>1</sup>, Gritsenko V. A.<sup>2</sup>

*1Institute of Immunology and Physiology, Yekaterinburg; 2 Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Orenburg; 3Southern Ural State University, Chelyabinsk, Russia*

The antibacterial, immunotropic and reparation effect of synthetic peptides of the GM-KSF active center and combinations of a preparation with various biologically active agents was studied. It was revealed that GM-KSF peptides interceed, lysozyme and supernatant of CD34<sup>+</sup> cells possess the expressed antibacterial activity, thus the combination of these substances demonstrates more expressed activity in comparison with single substances, therefore these substances influence both on growth, reproduction of bacteria, and their biofilm formation. At the same time synthetic peptides and their combinations with biologically active agents possess the immunostimulating and reparation activity. Possible mechanisms of the revealed effects of synthetic peptides and their combinations with other biologically active agents are discussed.

*Keywords:* GM-KSF peptides, CD34<sup>+</sup>45<sup>-</sup> cells, antibacterial, immunotropic and reparation activity.



## ФАКТОРЫ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА КАК МАРКЕРЫ ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ПРОЦЕССА ПРИ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЕ

Иванова И. А., Юдина С. М., Русанова Т. С., Сальникова И. Ю.,  
Архипова А. В., Тарабрина О. В.

*Курский государственный медицинский университет, Курск, Россия*

В работе показана роль факторов врожденного иммунитета в развитии иммунного воспаления при бронхиальной астме. Результаты исследования выявили нарушения продукции оксида азота, антимикробных пептидов у больных бронхиальной астмой. Это позволяет использовать оксид азота и дефензины, продуцируемые нейтрофилами, в качестве диагностических и прогностических маркеров течения воспалительного процесса при бронхолегочных заболеваниях.

*Ключевые слова:* врожденный иммунитет, бронхиальная астма.

Ведущую роль в патогенезе бронхиальной астмы (БА) играет прогрессирующее иммунное воспаление, характерной чертой которого является инфильтрация слизистой оболочки бронхиального дерева активированными эозинофилами, нейтрофилами, лимфоцитами, тучными клетками, ремодуляция ретикулярного слоя базальной мембраны альвеол, что в совокупности приводит к развитию гиперчувствительности и гиперреактивности бронхов [2, 5].

Индукция воспаления при БА сопровождается секрецией многочисленных медиаторов аллергической реакции, одним из которых является оксид азота (NO), усиливающий бронхиальный кровоток, эозинофильную инфильтрацию, повреждение дыхательного эпителия и ингибирующий пролиферацию Th1-клеток, сдвигая профиль T-клеточных цитокинов в сторону Th2 типа [4].

В ходе развития воспалительного процесса происходит избыточное накопление NO, приводящее к увеличению продуктов метаболизма NO – сильнейших оксидантов – пероксинитритного аниона (ONOO<sup>-</sup>), пероксинитритной кислоты (O NOOH), следствием чего является образование гидроксильного радикала (OH<sup>-</sup>). Накопление токсичных свободных радикалов ведет к реакции окисления липидов клеточных мембран, расширению и прогрессированию имеющегося воспаления дыхательных путей за счет увеличения сосудистой проницаемости, появления воспалительного отека.

Кроме того, высокие концентрации NO в эпителиальных или воспалительных клетках, образующиеся под воздействием цитокинов или эндотоксинов, могут подавлять активность конститутивной NO-синтазы и угнетать активность растворимой гуанилатциклазы, что приводит к уменьшению продукции циклического гуанозинмонофосфата, увеличению содержания внутриклеточного Ca<sup>2+</sup> и в конечном счете к спазму дыхательных путей [3].

В настоящее время, в связи с активным изучением роли катионных антимикробных пептидов (АМП), изменилось традиционное представление об эффекторных механизмах врожденного иммунитета. Человеческие дефензины представляют собой семейство амфифильных, катионных, богатых цистеиновыми остатками пептидов, молекула которых состоит всего из 29-47 аминокислотных остатков. Они защищают поверхности слизистых оболочек и кожных покровов от патогенных микроорганизмов и участвуют в регуляции жизнедеятельности эубиотической флоры и иммунной системы человека, тем самым предупреждая развитие инфекционных, воспалительных и аллергических заболеваний. В настоящее время выделяют три семейства пептидов-антибиотиков: дефензины, кателицидины и гистатины. Согласно данным современной литературы АМП являются ведущими компонентами неспецифической защиты респираторного тракта. Дефензины играют важ-

ную роль в саногенезе респираторного тракта при бронхиальной астмы, острых респираторных вирусных, бактериальных инфекций. Дефензины по праву считают эндогенными антибиотиками. Кроме этого установлено, что АМП способны служить хемоаттрактантами для многих типов иммунокомпетентных клеток (Т-лимфоцитов, дендритных клеток, нейтрофилов, макрофагов, моноцитов) [1].

Изменение уровня АМП отмечается при различных заболеваниях. Так, отмечено повышение пептидов – антибиотиков при воспалительных заболеваниях (синуситы, пиелонефриты, эмпиемы, неонатальные пневмонии, гастриты), травмах (в т.ч. дистресс-синдром), идиопатических заболеваниях (псориаз, плоский лишай).

В связи с этим **целью работы** явилось изучение состояния факторов врожденного иммунитета у больных бронхиальной астмой.

Под нашим наблюдением находилось 52 пациента со смешанной формой бронхиальной астмы. Средний возраст больных составил  $35,4 \pm 3,3$  года, среди них женщины – 48%, мужчины – 52%; жители села – 64,8%, города – 35,2%. Все больные получали базисную терапию ингаляционными глюкокортикостероидами соответственно ступени заболевания и  $\beta_2$ -агонисты короткого действия по требованию.

Оценку состояния врожденного иммунитета проводили по исследованию содержание оксида азота спектрофотометрическим методом по суммарной концентрации нитратов и нитритов с помощью реактива Грисса,  $\alpha$ -дефензинов (HNP1–3) методом ИФА в сыворотке периферической крови больных бронхиальной астмой.

Результаты исследования выявили увеличение уровня оксида азота в периферической крови больных бронхиальной астмой в 1,8 раза по сравнению со здоровыми донорами.

Как известно, человеческие дефензины нейтрофилов ( $\alpha$ -дефензины), обладают микробоцидной, хемотаксической, иммуномодулирующей и цитотоксической активностью. Исследование уровня дефензинов нейтрофилов (HNP1–3) в периферической крови больных бронхиальной астмой показало значительное повышение их концентрации (в 15 раз) по сравнению со здоровыми донорами.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о существенных нарушениях факторов врожденного иммунитета (продукции оксида азота, антимикробных пептидов) у больных бронхиальной астмой. Что позволяет сделать вывод о том, что оксид азота и дефензины нейтрофилов являются одними из маркеров воспаления, в том числе в дыхательных путях, а уровень их коррелирует со степенью воспалительных изменений в слизистой бронхиального дерева, что дает возможность использовать эти маркеры в качестве диагностических и прогностических маркеров течения воспалительного процесса при бронхолегочных заболеваниях.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Будихина А. С., Пинегин Б. В. // Иммунология. – 2008. – Т. 29, № 5. – С. 317-320.
2. Иванова И. А., Юдина С. М., Коршикова М. Ю. // Российский аллергологический журнал. – 2011. – № 4, выпуск 1. – С. 149-150
3. Кокряков В. Н., Ковальчук Л. В., Алешина Г. М., Шамова О. В. // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2006. – № 2. – С. 98-105.
4. Рябова Л. В., Зурочка А. В., Хайдуков С. В. Медицинская иммунология. – 2009. – Т. 11, № 2–3. – С. 169-176.
5. Юдина С. М., Иванова И. А., Русанова Т. С., Сальникова И. Ю. Медицинская иммунология. – 2009. – Т. 11, № 4–5. – С. 362.

#### FACTORS OF INNATE IMMUNITY AS MARKERS OF INFLAMMATORY PROCESS IN BRONCHIAL ASTHMA

Ivanova I. A., Yudina S. M., Rusanova T. S., Salnikova I. Y., Arkhipova A. V., Tarabrina O. V.

*Kursk State Medical University, Kursk, Russia*

In research the role of factors of innate immunity in development of an immune inflammation at bronchial asthma is studied. Results of investigations revealed the disorders of production of nitrogen oxide, antimicrobial peptides at patients with bronchial asthma. It allows using nitrogen oxide and defensins produced by neutrophils as diagnostic and predictive markers of inflammation in bronchopulmonary diseases.

*Key words:* innate immunity, bronchial asthma.

## ОСОБЕННОСТИ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ И ВЕГЕТАТИВНЫХ НАРУШЕНИЙ У ДЕТЕЙ С БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ

Каримова Н. И., Шамсиев Ф. М.

*Республиканский специализированный научно-практический центр педиатрии МЗ РУз,  
Ташкентский Педиатрический Медицинский Институт, Ташкент, Узбекистан*

Нарушение вегетативной регуляции лежит в основе ряда патологических состояний и хронических заболеваний. Динамика вегетативных показателей опережает клинико – лабораторную картину, и поэтому регистрация этих изменений и их правильная интерпретация позволяют диагностировать заболевание в доклинической стадии, что важно для предупреждения развития болезни и ее осложнений. Под нашим наблюдением находились 20 детей дошкольного возраста с бронхиальной астмой и 35 детей с острым бронхитом. Состояние ВНС у больных изучалось согласно общепринятой схемы изучения ВНС. Для изучения вегетативного гемостаза проводилось кардиоинтервалографическое исследование. По результатам исследования стало ясно что в формировании ОБ и БА у детей дошкольного возраста существенную роль играют вегетативные дисфункции, которые характеризуются преобладанием гиперсимпатикотонической и асимпатикотонической вегетативной реактивностью. Полученные данные указывают на необходимость медикаментозной коррекции, с учетом вегетативной реактивности под контролем кардиоинтервалографических исследований.

*Ключевые слова:* бронхиальная астма, острый бронхит, кардиоинтервалография, вегетативные нарушения, иммунология.

Одной из наиболее сложнорешаемых и дискутабельных проблем в педиатрической практике является диагностика бронхиальной астмы (БА) по первым эпизодам бронхиальной обструкции (БО), особенно у детей грудного, раннего и дошкольного возрастов. Этот факт вызывает тревогу, так как особенностью синдрома БО является высокий процент рецидивирования, что способствует развитию БА и инвалидизации детей в более позднем периоде [1,3]. В педиатрии проведены широкие исследования у детей с БОС и БА. Между тем, неясными на сегодняшний день являются закономерности трансформации заболеваний, протекающих с БОС, в БА. Своевременная диагностика БА у детей и контроль за её течением предотвращает развитие тяжелых форм заболевания. Значительное число отечественной и зарубежной литературы посвящено БА, встречаются лишь единичные исследования, в которых авторы проводят дифференциальную диагностику между БА и острым обструктивным бронхитом и отсутствуют работы, посвященные комплексному сравнительному анализу факторов, способствующих развитию заболеваний органов дыхания, со-

провождающихся БОС. Поэтому крайне важным представляется выявление данной патологии на самых ранних стадиях ее развития с использованием средств, доступных врачам первичного звена здравоохранения [2,4].

**Цель исследования.** Проанализировать показатели иммунного статуса и установить роль вегетативного гомеостаза в формировании обструктивного бронхита и бронхиальной астмы у детей.

**Материал и методы исследования.** Под нашим наблюдением находились 20 детей с БА и 35 детей с обструктивным бронхитом дошкольного возраста. Для изучения ВНС использовали кардиоинтервалографический (КИГ) метод расчета исходного вегетативного тонуса (ИВТ) и вегетативной реактивности (ВР). КИГ является неспецифическим методом оценки адаптационно – компенсаторных реакций.

Иммунологические исследования проводились изучением количественного определения лимфоцитов с фенотипом CD3, CD4, CD8, CD16, CD20 с помощью моноклональных антител серии LT, фагоцитарную активность нейтрофилов, иммуноглобулины А, М и G.

Результаты исследования показали, что в период обострения у обследованных больных с БА и ОБ имеются признаки дисфункции со стороны ВНС. В периоде обострения имели признаки симпатических реакций ВНС. Сухость кожных покровов чаще выявлялись у детей с БА (88%), реже у больных с ОБ (80%). Явления локального гипергидроза в виде влажности ладоней и стоп преобладали у больных с ОБ – 88%, реже у детей с БА – 52%. Белый дермографизм у больных ОБ – 94%, красный стойкий дермографизм – 5,8% случаев, при БА в 7,8% случаев. Повышение температуры до фебрильных величин отмечалось у 78% детей с ОБ и 40% больных с БА. Жажда была повышенной у 60% больных с БА и 47% больных с ОБ, пониженной 52,9% с ОБ и 40% с БА.

Учитывались жалобы на тошноту, рвоту, боли в животе, которые чаще предъявляли больные с БА (40%), значительно реже больные с ОБ (37%). Ночной энурез выявлялся у больных с БА 34% случаев и ОБ в 23,5%. Аллергические реакции чаще наблюдались у больных с БА 24%, реже у детей с ОБ – 10,7%. Нарушения сна в виде симпатических реакций чаще встречаются у детей с ОБ – 54%, реже у больных с БА – 34%.

У 88,8% детей с БА наблюдался гиперсимпатикотонический вегетативный тонус (ИВТ), симпатикотонический (СТ) ИВТ – не определялся, эйтония – у 11,1%. Среди больных с БА преобладали дети с гиперсимпатикотоническим ИВТ. Преобладание гиперсимпатикотонии указывало на наличие у детей активации симпато-адреналовых компенсаторных механизмов. Наличие у небольшой части больных эйтонии не свидетельствовало об отсутствии у них реакции ВНС. При анализе клинической симптоматики у этих больных отмечено одновременное проявление активности и симпатического и парасимпатического отделов ВНС, что и вело к выявлению эйтонии на КИГ. У 94,4% детей с ОБ также наблюдался гиперсимпатикотонический вегетативный тонус, симпатикотонический ИВТ – у 1,9%, эйтония – у 3,7%. Среди больных с ОБ преобладали дети с гиперсимпатикотоническим ИВТ. Клинические наблюдения вегетативного ответа на воспалительный процесс подтверждались результатами КИГ исследований.

У детей с БА заболевание сопровождалось дефицитом со стороны Т-системы иммунитета. В период обострения наблюдалось достовер-

ное, снижение относительного и абсолютного количества Т-лимфоцитов (CD3)  $45,0 \pm 1,3\%$ ;  $835,6 \pm 21,0$  против  $68,4 \pm 1,7\%$ ;  $1610,0 \pm 36,0$ , которое зависело от тяжести течения заболевания и было обусловлено снижением содержания относительного и абсолютного количества Т-хелперов (CD4) и Т-супрессоров (CD8), что составило  $30,2 \pm 1,0\%$ ,  $254,6 \pm 16,7$ ;  $21,4 \pm 1,6\%$ ;  $188,2 \pm 6,0$  соответственно, против  $45,3 \pm 1,6\%$ ,  $724,0 \pm 25,0$ ;  $23,5 \pm 0,8\%$ ,  $376,0 \pm 8,5$  ( $P < 0,001$ ) по сравнению с показателями детей с ОБ. Также было достоверно повышенным относительное и абсолютное количества В-лимфоцитов (CD19), что составило  $24,1 \pm 1,6\%$ ;  $448,5 \pm 16,1$  по сравнению с показателями детей с ОБ ( $15,1 \pm 1,1$ ;  $351,0 \pm 14,0$ ,  $P < 0,01$ ).

Наблюдалось изменение гуморального звена иммунитета, которое заключалось в понижении уровня в сыворотке крови IgA и IgM, что составило  $112,8 \pm 6,4$  мг,%;  $92,8 \pm 7,2$  мг,% соответственно, по сравнению с показателями здоровых детей ( $161,0 \pm 6,0$  мг,%;  $102,0 \pm 7,0$  мг,%,  $P < 0,01$ ). Снижение концентрации IgA может быть обусловлено интенсивным потреблением их в реакциях иммунной защиты. Также отмечалась снижение ЕК (CD16) до  $4,8 \pm 0,8\%$ . Супрессия ЕК у детей объясняется, видимо, исходно сниженным их содержанием у этих больных. При изучении фагоцитарной системы было выявлено количественное изменение, которое проявлялось достоверным снижением фагоцитарной активности нейтрофилов  $45,7 \pm 1,0$  против  $63,7 \pm 2,4$  ( $P < 0,001$ ).

**Выводы.** Таким образом, в формировании ОБ и БА у детей дошкольного возраста существенную роль играют вегетативные дисфункции, которые характеризуются преобладанием гиперсимпатикотонической и асимпатикотонической вегетативной реактивности. Полученные данные указывают на необходимость медикаментозной коррекции, с учетом вегетативной реактивности под контролем кардиоинтервалографических исследований.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алтыбаева С. Ш. // Педиатрия. – 1997. – № 1. – С. 23-26.
2. Вейн А. М. Вегетативные расстройства. Клиника. Диагностика. Лечение. М.; 2000.
3. Панкова Т. Б., Бородулина Т. А. // Российский педиатрический журнал. – 2002. – № 3. – С. 16-21.
4. Шилиев Р. Р., Смирнова Т. Л., Чемоданов Е. Б. // Российский педиатрический журнал. – 1999. – № 1. – С. 11-16.

## IMMUNOLOGIC AND VEGETATIVE DISORDERS FEATURES IN CHILDREN WITH BRONCHIAL ASTHMA

Karimova N. I., Shamsiev F. M.

*Republican Specialized Scientific and Practical Center of Pediatric Uzbekistan, Tashkent  
Pediatric Medical Institute, Tashkent, Uzbekistan*

Autonomic imbalance underlies a number of pathological conditions and chronic diseases. Dynamics of vegetative indices ahead of clinical – laboratory picture, and therefore registration of these changes and their correct interpretation can diagnose the disease in preclinical stage, which is important for preventing the development of the disease and its complications. We observed 20 children with asthma and 35 children with acute bronchitis. State VNS patients studied according to the general scheme of the study of VNS. To study the vegetative hemostasis cardiointervalographic conducted the study. According to the study, it became clear that the formation of the Republic of Belarus with the phenomena of BO and asthma in preschool children play an important role autonomic dysfunction, characterized by a predominance of gipersimpatikotonicheskoy asimpatikotonicheskoy and autonomic reactivity. These findings indicate the need for medical correction, based on autonomic reactivity under control cardiointervalographic research.

*Key words:* bronchial asthma, acute bronchitis, cardiointervalography, autonomic disorders, immunology.

## ХАРАКТЕРИСТИКА ИММУННОГО ОТВЕТА НА ПРОТИВОАЛЛЕРГЕННУЮ КАПСУЛИРОВАННУЮ ВАКЦИНУ

Каширина Е. И.<sup>1</sup>, Савина А. А.<sup>2</sup>, Щербинина Т. С.<sup>2</sup>

*<sup>1</sup>ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина  
и Ю. А. Овчинникова РАН; <sup>2</sup>ФГБОУ ВПО Московская государственная академия  
ветеринарной медицины и биотехнологии имени К. И. Скрябина; <sup>3</sup>ФГБУН Центр  
«Биоинженерия» РАН, Москва, Россия*

Аллергия I типа начинается в детском возрасте и может прогрессировать в тяжелые формы: астму и атопический дерматит. Ранняя аллерген-специфическая терапия (АСИТ) предупреждает атопический марш. В настоящее время для АСИТ используют введение низких доз экстрактов аллергенов, что связано с опасностью побочных эффектов. Нами ранее разработана структура прототипов противоаллергенных вакцин на основе упаковки рекомбинантных аллергенов в полимерные наночастицы, что закрывает участки связывания аллергенов с IgE антителами и позволяет вводить значительно более высокие концентрации аллергенов без риска побочных эффектов. В данной работе проведен анализ гуморального и клеточного ответа на капсулированную вакцину, полученную упаковкой модельного белка лактоферрина в полимерные наночастицы на основе хитозана и альгината. Показана эффективная индукция IgG ответа *in vivo* у мышей всеми конструкциями. Конструкции с хитозаном и альгинатом стимулировали продукцию общего IgE. Иммунизация лактоферрином приводила к увеличению доли CD8<sup>+</sup> пролиферирующих клеток, а капсулированный белок – к увеличению доли CD4<sup>+</sup> Т-клеток. Конструкция лактоферрин-хитозан-альгинат была токсична и вызывала снижение клеточности лимфоидных органов.

*Ключевые слова:* аллергия, противоаллергенные вакцины, хитозан, наночастицы, клеточный ответ, токсичность.

**Актуальность и цель работы.** Аллергия I типа начинается в детском возрасте и может прогрессировать в тяжелые формы: астму и атопический дерматит. Ранняя аллерген-специфическая терапия (АСИТ) предупреждает атопический марш. В настоящее время для АСИТ используют введение низких доз экстрактов аллергенов, что связано с опасностью

побочных эффектов. Нами ранее разработана структура прототипов противоаллергенных вакцин на основе упаковки рекомбинантных аллергенов в полимерные наночастицы, что закрывает участки связывания аллергенов с IgE антителами и позволяет вводить значительно более высокие концентрации аллергенов без риска побочных эффектов [1, 2]. Целью данной работы было изучение типа клеточного ответа при введении наночастиц и обнаружение побочных эффектов вакцинации.

**Материалы и методы.** В работе использовали модельный белок лактоферрин (ЛФ), который упаковывали в наночастицы хитозана (ХТ), а затем дополнительно покрывали оболочкой из альгината (АЛГ) как описано ранее [1]. Мышей CD1 иммунизировали трижды с интервалом в 3-4 дня внутрибрюшинно 100 мкл свободного ЛФ, ЛФ, упакованного в ХТ, или ЛФ, упакованного в ХТ и АЛГ. Концентрация ЛФ, ХТ и АЛГ составила 40, 50 и 100 мкг/мышь соответственно. Сыворотки крови отбирали через 3 недели для анализа гуморального ответа, мышей забивали через 4 месяца и забирали кровь, селезенки и лимфоузлы из пейеровых бляшек. Фенотип клеток анализировали методом проточной цитометрии на приборе FACScan (BD) с использованием антител к CD4 и CD8 маркерам (BD). Лимфоциты стимулировали *in vitro* ЛФ в дозе 40 мкг/мл и инкубировали 6 дней. Оценивали CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клетки среди бластных клеток. Анализ гуморального ответа проводили методом ИФА.

**Результаты и обсуждение.** Анализ ЛФ-специфических IgG и IgE и общего IgE показал

формирование через 3 недели высокоаффинных IgG антител во всех группах. Титр антител был в 3 раза выше в группе свободного ЛФ и сравним в группах ЛФ-ХТ и ЛФ-ХТ-АЛГ. Иммунизация вызывала повышение общего IgE при отсутствии ЛФ-специфического IgE. Соответственно, капсулирование ЛФ замедляло, но не мешало распознаванию антигена В-клетками. Введение хитозана и альгината приводило к стимуляции врожденной системы иммунитета и продукции IgE. Анализ пролиферирующих Т-клеток показал, что в группе ЛФ стимуляция антигеном *in vitro* приводила к снижению CD4/CD8 с 3.0 до 2.2, показывая преимущественную активацию CD8<sup>+</sup> Т-клеток, а в группах ЛФ-ХТ и ЛФ-ХТ-АЛГ эффект был противоположным и индекс достигал значений 4,6 и 4,4 соответственно. Введение индукторов неспецифического иммунитета в состав вакцины стимулировало формирование CD4<sup>+</sup> клеток 2 типа. Кроме того, в группе ЛФ-ХТ-АЛГ была снижена клеточность лимфоидных органов, и процент мертвых клеток был более высоким, что может быть связано с различием заряда вакцин. В дальнейшем требуется определение причины токсичности конструкции ЛФ-ХТ-АЛГ и оптимизация протокола вакцинации для дальнейшего продвижения прототипов вакцины.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Каширина Е. И., Решетов П. Д., Алексеева Л. Г. и др. Российские нанотехнологии 2015, 2, 23-28.
2. Каширина Е. И., Решетов П. Д., Алексеева Л. Г. и др. Российский иммунологический журнал 2014, 8 (17), 901-904.

### TYPING OF IMMUNE RESPONSES TO ANTIALLERGIC CAPSULATED VACCINE

Kashirina E. I.<sup>1</sup>, Savina A. A.<sup>2</sup>, Shcherbinina T. S.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>M.M. Shemyakin and Yu.A. Ovchinnikov Institute of bioorganic chemistry of the RAS;

<sup>2</sup>Skryabin Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology;

<sup>3</sup>Centre "Bioengineering" of the RAS, Moscow, Russia

Type I allergy usually starts in childhood and can progress to severe forms such as asthma and atopic dermatitis. Early antigen-specific immunotherapy (ASIT) prevents the atopic march. Modernly ASIT is based on the injection of low doses of allergen extracts due to a possibility of side effects. Earlier we have developed the structure of antiallergic vaccines based on the capsulation of recombinant allergens into polymeric nanoparticles masking IgE binding sites of allergens. As a result, higher doses of allergen can be injected without side effects. In this work the analysis of humoral and cellular immune responses to capsulated vaccines was conducted. We used lactoferrin as a model allergen and capsulated it into chitosan or chitosan-alginate nanoparticles. All constructs effectively induced in mice the IgG specific to lactoferrin. Besides, chitosan and alginate coated vaccines induced an increase in total but not specific IgE. Lactoferrin induced the proliferation of CD8<sup>+</sup> T cells *in vitro* after the specific stimulation while capsulated lactoferrin induced CD4<sup>+</sup> activation. The construct with chitosan and alginate was toxic and induced a decrease in cellularity of lymphoid organs.

## ВЛИЯНИЕ БАЛЬНЕОПЕЛОИДОТЕРАПИИ НА ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ДЕТЕЙ С ПОРОКАМИ РАЗВИТИЯ ОПОРНО-ДВИГАТЕЛЬНОГО АППАРАТА

Климова А. Р., Сетко Н. П., Лебедькова С. Е., Лившиц Н. М.

ГБОУ ВПО «Оренбургский государственный медицинский университет»,  
Оренбург, Россия

С целью определения эффективности бальнеопелоидотерапии проведены клинические и иммунологические исследования детей и подростков пороками развития опорно-двигательного аппарата (ОДА). Комбинированное применение аппликаций сульфидной иловой грязи озера Тузлучное и высокоминерализованной хлоридной натриевой воды озера Развал у больных с пороками развития ОДА обладает благоприятным действием на основные клинические симптомы заболевания, нормализует показатели иммунной системы.

*Ключевые слова:* бальнеопелоидотерапия, иммунологические показатели, пороки развития, дети.

В настоящее время местные природные факторы востребованы на рынке медицинских услуг в связи с высокой распространенностью патологии опорно-двигательного аппарата (ОДА), низкой стоимостью и простотой применения метода [3,4]. На территории Соль-Илецкого района Оренбургской области располагаются сульфидные иловые грязи озера Тузлучное и высокоминерализованная хлоридная натриевая вода озера Развал. Несмотря на то, что эта уникальная природно-климатическая зона уже давно используется для лечения детей с различной патологией до настоящего времени не было изучено влияние сульфидных иловых грязей и рапных ванн на динамику клинических симптомов, состояние иммунной системы у детей и подростков с патологией ОДА.

**Цель исследования** – оценить клинико-иммунологическую эффективность бальнеопелоидотерапии у детей с пороками развития ОДА в процессе лечения и в анамнезе через 3, 6 и 12 месяцев.

Проведено обследование 59 детей с пороками развития ОДА (врожденный вывих бедра, врожденная косолапость) до и после проведения бальнеопелоидотерапии, а так же в анамнезе через 3, 6 и 12 месяцев. Оценка состояния ОДА проводилась с помощью клинических, лабораторных и инструментальных методов исследования. Оценку боли проводили по визуально-аналоговой шкале (ВАШ) в сантиметрах, индексу Ричи (баллы), болевому синдрому (баллы). Определение функциональных

возможностей пациента проводили с помощью индекса Лекена, измерение объема движений суставов с помощью гониометрического метода [1,2]. Помимо клинического обследования проводилось исследование иммунного статуса. Иммунологические показатели сравнивались с региональными нормативами показателей системы иммунитета для детей и подростков Оренбургской области.

Бальнеопелоидотерапия проводилась методом систематического чередования грязевых аппликаций и рапных ванн. Температура сульфидной иловой грязи составляла 37–39°C, продолжительность процедуры 5-10-15 минут. Рапные ванны – температура 37°C, экспозиция 5-10-12 минут (в зависимости от возраста). Курс лечения включал по 10 ванн и аппликаций. Объективная оценка эффективности бальнеопелоидотерапии проводилась на основании динамики клинических и иммунологических показателей сразу после лечения, через 3, 6 и 12 месяцев.

После проведенного лечения достоверно наблюдалось уменьшение боли в пораженных суставах от выраженной до слабой с  $0,86 \pm 0,04$  балла до  $0,31 \pm 0,06$  балла ( $p < 0,001$ ) после лечения, через 3 месяца болевой синдром отсутствовал, через 6 и 12 месяцев этот показатель составил  $0,23 \pm 0,08$  ( $p < 0,001$ ) и  $0,40 \pm 0,08$  ( $p < 0,001$ ) баллов соответственно. Достоверно наблюдалось уменьшение интенсивности боли по визуально-аналоговой шкале после лечения в 3 раза (до лечения –  $3,34 \pm 0,30$  см, после ле-

чения –  $0,97 \pm 0,18$  см ( $p < 0,001$ )), через 6 и 12 месяцев –  $0,80 \pm 0,21$  см ( $p < 0,001$ ) и  $1,43 \pm 0,31$  см ( $p < 0,001$ ) соответственно. Индекс Ричи в процессе лечения достоверно снизился с  $1,36 \pm 0,12$  до  $0,32 \pm 0,08$  ( $p < 0,001$ ) после лечения, через 6 и 12 месяцев на этот показатель пришлось  $0,23 \pm 0,09$  и  $0,60 \pm 0,13$  баллов ( $p < 0,001$ ). Ограничение подвижности в суставах при данном виде лечения уменьшилось с  $1,34 \pm 0,11$  до  $0,39 \pm 0,09$  баллов ( $p < 0,001$ ) после лечения и  $0,11 \pm 0,05$  баллов ( $p < 0,001$ ) через 3 месяца, до  $0,26 \pm 0,09$  ( $p < 0,001$ ) и  $0,57 \pm 0,14$  баллов ( $p < 0,001$ ) через 6 и 12 месяцев. Параллельно уменьшению болей у больных с пороками развития ОДА наблюдалось увеличение амплитуды движений в суставах. У 15% детей на 1 см уменьшилась разница в длине нижних конечностей. Достоверно отмечалось снижение показателей индекса Леке-на с  $4,56 \pm 0,45$  до  $2,03 \pm 0,32$  баллов ( $p < 0,001$ ) после лечения,  $0,60 \pm 0,26$  баллов ( $p < 0,001$ ) через 3 месяца, через 6 и 12 месяцев этот показатель составил  $1,17 \pm 0,30$  и  $1,54 \pm 0,32$  балла ( $p < 0,001$ ) соответственно.

Установлено, что бальнеопелоидотерапия оказывает положительный эффект не только на клинические, но и на иммунологические показатели. Средние параметры клеточного иммунитета сразу после курса лечения существенно не изменились, положительная динамика появилась лишь через 6 месяцев. Так, у всех детей отмечалось увеличение содержания CD3 клеток с  $52,20 \pm 1,37\%$  до  $63,83 \pm 1,04\%$  ( $p < 0,001$ ) через 6 месяцев, у 80% детей через 12 месяцев этот показатель сохранялся в пределах нормы. В динамике через 6 месяцев у 90% детей с пороками развития ОДА наблюдалось достоверное увеличение CD4 клеток с  $38,06 \pm 1,00\%$  до  $43,33 \pm 1,36\%$  ( $p < 0,05$ ), что соответствовало региональным нормативам. У 90% больных было выявлено

повышение количества CD8 клеток с  $21,40 \pm 0,86\%$  до региональных норм –  $24,50 \pm 0,44\%$  ( $p < 0,01$ ) через 6 месяцев, у 80% детей через год этот показатель был в пределах нормы. Через 6 месяцев после курса бальнеопелоидотерапии у 75% больных с пороками развития опорно-двигательного аппарата уровень CD19 клеток нормализовался. Положительная динамика наблюдалась и со стороны показателей гуморального иммунитета: у 72,7% детей отмечалась тенденция к снижению уровня сывороточного иммуноглобулина класса А сразу после лечения, достоверно уменьшился уровень циркулирующих иммунных комплексов с  $76,20 \pm 5,57$  ЕД до региональных нормативов –  $53,45 \pm 4,68$  ЕД после бальнеопелоидотерапии.

**Выводы:** 1. Комбинированное применение аппликаций сульфидной иловой грязи озера Тузлучное и высокоминерализованной хлоридной натриевой воды озера Развал у больных с пороками развития патологией ОДА обладает благоприятным действием на основные клинические симптомы заболевания. Повторные курсы воздействия рекомендуется проводить через 8 месяцев.

2. Наряду с положительным терапевтическим эффектом бальнеопелоидотерапия оказывает нормализующий эффект на иммунный статус детей с пороками развития ОДА.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Клиническая ревматология (руководство для практических врачей). Под ред. В. И. Мазурова. Фолиант СПб., 2001, 416.
2. Мицкевич В. А. Ортопедия первых шагов. БИНОМ, Москва 2013, 359.
3. Отчет о состоянии здравоохранения в мире. ВОЗ. Женева 1997, 457.
4. Физиотерапия и курортология. Под ред. В. М. Боголюбова. Книга 1. БИНОМ, Москва 2008, 408.

### THE EFFECT OF BALNEOPELOIDOTHERAPY ON THE IMMUNOLOGICAL PARAMETERS OF CHILDREN WITH MALFORMATIONS OF THE MUSCULOSKELETAL SYSTEM

Klimova A. R., Setco N. P., Lebedkova S. E., Livshits N. M.

Orenburg State Medical University, Orenburg, Russia

Summary. For the purpose of efficiency definition balneopeloidotherapy are made clinical and immunological researches of children and teenagers with congenital malformations of the musculoskeletal system. A combined application of applications of sulphide silt mud and highly mineralized chloride sodium water in patients with congenital malformations of the musculoskeletal system has the positive influence of the main clinical symptoms of the disease, normalizes the performance of the immune system.

*Keywords:* balneology peloidotherapy, immunological parameters, malformations, children.



## ВЛИЯНИЕ ПАПИЛЛОМАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ НА КЛЕТОЧНЫЕ ФАКТОРЫ СИСТЕМНОГО И ЛОКАЛЬНОГО ИММУННОГО ОТВЕТА У МУЖЧИН, ИНФИЦИРОВАННЫХ ХЛАМИДИЯМИ ИЛИ ГЕНИТАЛЬНЫМИ МИКОПЛАЗМАМИ

Ковалев Д. А.

*Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Южно-Уральский государственный медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации, Челябинск, Россия*

**Цель исследования.** Исследовать состояние клеточных факторов иммунитета в эякуляте и периферической крови мужчин с ПВИ в ассоциации с другими инфекциями, передаваемыми половым путем. **Материалы и методы.** Обследованы 76 человек: мужчины репродуктивного возраста, инфицированные хламидиями, генитальными микоплазмами, ВПЧ, а также пациенты с сочетанным течением этих инфекций. Проведено иммунологическое исследование клеточных факторов иммунитета в периферической крови и эякуляте, микроскопия отделяемого уретры, детекция возбудителя методом ПЦР, статистические методы обработки материала. **Выводы.** ПВИ не оказывает значительного влияния на клеточные факторы системного иммунного ответа. При сочетанном течении ПВИ и бактериальных ИППП отмечается более выраженный воспалительный процесс в уретре, чем при изолированном течении этих инфекций. Бактериально-вирусная инфекция мочеполювых органов мужчин характеризуется более выраженным воздействием на отдельные факторы системного и местного иммунного ответа (функциональная активность нейтрофилов), чем в случае изолированного течения бактериальных ИППП или ПВИ.

**Ключевые слова:** папилломавирусная инфекция у мужчин, иммунный ответ, бактериально-вирусная инфекция.

**Введение.** В настоящее время папилломавирусная инфекция (ПВИ) является одной из самых распространенных вирусных инфекций, передаваемых половым путем. В последние 10 лет исследователи констатировали связь онкологических заболеваний у мужчин с вирусом папилломы человека (ВПЧ) [1]. На сегодняшний день не раскрыты многие вопросы персистенции ВПЧ у мужчин. Особенно актуальна эта проблема, в тех случаях, когда ПВИ ассоциирована с другими инфекциями, передаваемыми половым путем (ИППП) [2]. Вопрос синергического воздействия ПВИ на течение бактериальных ИППП до сих пор остается открытым [3].

**Цель исследования.** Исследовать состояние клеточных факторов иммунитета в эякуляте и периферической крови мужчин с ПВИ в ассоциации с другими инфекциями, передаваемыми половым путем.

**Материалы и методы.** С марта 2013 по январь 2014 гг. обследованы 76 человек: мужчи-

ны репродуктивного возраста (18-49 лет, средний возраст –  $31 \pm 3$  года), инфицированные хламидиями, генитальными микоплазмами, ВПЧ, а также пациенты с сочетанным течением этих инфекций.

Проведено иммунологическое исследование клеточных факторов иммунитета в периферической крови и эякуляте: подсчет общего количества лейкоцитов, определение фагоцитарной и лизосомальной активности нейтрофилов, НСТ-тест. Качественное определение наличия ВПЧ и ИППП в соскобах из уретры проводилось методом ПЦР Real-time. Микроскопия отделяемого уретры с окраской по Грамму. Статистические методы обработки материала с использованием пакета «Statistica 6.0»

Группу 1 составили 20 пациентов, у которых методом ПЦР в соскобах из уретры обнаружен только ВПЧ. В группу 2 включены 18 пациентов с хламидиями или генитальными

ми микоплазмами. В группу 3 – 21 пациент, с сочетанием персистирующей ПВИ и хламидийной либо микоплазменной инфекций. В группу 4 – 17 условно-здоровых мужчин.

**Результаты и обсуждение.** При исследовании клеточных факторов системного иммунного ответа получены следующие результаты.

Абсолютное и относительное содержание нейтрофилов было повышено в группах пациентов с хламидийной и микоплазменной инфекциями и с бактериально-вирусной инфекцией относительно показателей здоровых мужчин. Повышение активности спонтанного НСТ-теста отмечено в группах 1 ( $20,77 \pm 1,74\%$ ), 2 ( $32,44 \pm 2,14\%$ ) и 3 ( $33,55 \pm 2,15\%$ ), относительно здоровых мужчин ( $12,67 \pm 0,25\%$ ). При бактериальной и бактериально-вирусной инфекции в периферической крови мужчин количество нейтрофилов, спонтанно восстанавливающих НСТ достоверно выше, чем у мужчин с ПВИ.

Повышение значения индуцированного НСТ-теста отмечалось в группах пациентов с бактериальной и бактериально-вирусной инфекцией. Фагоцитарная активность была снижена, а лизосомальная – повышена в группах 2 и 3 относительно здоровых мужчин.

У пациентов в группе с бактериально-вирусной инфекцией функциональный резерв нейтрофилов был достоверно ниже, чем у мужчин с моно-инфекцией.

Показатели фагоцитарной активности в группах 1 ( $52,92 \pm 1,83\%$ ) и 2 ( $51,75 \pm 2,11\%$ ) существенно не отличались, и были выше, чем этот показатель в группе 3 ( $44,46 \pm 3,41\%$ ). Лизосомальная активность также была примерно одинакова в группах 1 ( $300,71 \pm 11,24$  у.е.) и 2 ( $99,42 \pm 13,17$  у.е.), и снижена в группе 3 ( $264,11 \pm 10,45$  у.е.), по сравнению с ними.

Увеличение общего числа нейтрофилов крови, при угнетении функции фагоцитоза и снижении их функционального резерва характерно для хронических воспалительных заболеваний и, в целом, соответствует данным других исследователей [4].

Исследование клеточных факторов местного иммунитета в эякуляте мужчин показало: в группах 1 и 2 отмечено увеличение числа лейкоцитов в эякуляте, увеличение относительного содержания мононуклеаров, лизосомальной активности, числа нейтрофилов, спонтанно восстанавливающих НСТ, снижение функционального резерва нейтрофилов

в НСТ-тесте и снижение фагоцитарной активности нейтрофилов относительно здоровых мужчин.

В группе 3 отмечалось более выраженное угнетение фагоцитоза, и снижение общего количества нейтрофилов как относительно группы 1 (ПВИ) и 4 (здоровых мужчин), так и относительно их количества в группе 2. У пациентов в группе 1 также отмечалось изменение этих факторов относительно здоровых мужчин. Кроме того, в группе 3 отмечалось достоверное усиление внутриклеточного кислородзависимого метаболизма нейтрофилов в спонтанном и индуцированном НСТ-тесте при снижении их функционального резерва относительно других групп исследования.

При исследовании уретрального мазка, отмечено нормальное содержание лейкоцитов в группах пациентов с ПВИ ( $0,53-2,40$  в п/зр.) и у здоровых мужчин ( $0,33-2,26$  в п/зр.). У мужчин бактериальными ИППП число лейкоцитов в отделяемом уретры было выше ( $5,88-8,54$  в п/зр.), чем у здоровых, но ниже, чем у пациентов с бактериально-вирусной инфекцией ( $9,88-12,54$  в п/зр.).

#### **Выводы.**

1. ПВИ не оказывает значительного влияния на клеточные факторы системного иммунного ответа.

2. При сочетанном течении ПВИ и бактериальных ИППП отмечается более выраженный воспалительный процесс в уретре, чем при изолированном течении этих инфекций.

3. Бактериально-вирусная инфекция мочеполовых органов мужчин характеризуется более выраженным воздействием на отдельные факторы системного и местного иммунного ответа (функциональная активность нейтрофилов), чем в случае изолированного течения бактериальных ИППП или ПВИ.

#### **СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Colón-López V., Ortiz A. P., Palefsky J. Health Sci J. 2010 September; 29 (3): 232-240.
2. Гомберг М. А., Соловьев А. М. // Мед. совет. – 2009. – Вып. 3. – 12–18 с.
3. Zheng M. Y., Zhao H. L., Di J. P. et al. // Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi. 2010 Jun; 45 (6): 424–8с.
4. Зиганшин О. Р. // диссертация на соискание ученой степени доктора медицинских наук, Челябинск, 2002. с.159.

## INFLUENCE OF HPV INFECTION IN CELLULAR FACTORS SYSTEMIC AND LOCAL IMMUNE RESPONSE IN MEN INFECTED CHLAMYDIA OR GENITAL MYCOPLASMAS

Kovalev D.

*South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russia*

**Objective.** Explore the state of cellular immunity factors in semen and blood of men with human papilloma virus (HPV) infection in association with other sexually transmitted infections. **Materials and methods.** 76 people included in research: men of reproductive age who are infected with chlamydia, genital mycoplasmas, HPV, as well as patients with concomitant occurrence of these infections. The immunological study of cellular immunity factors in peripheral blood and semen, urethral discharge microscopy, pathogen detection by PCR, statistical methods of processing material. **Conclusions.** HPV infection in male had no significant effects on cellular factors systemic immune response. When HPV infection combined with chlamydial or mycoplasma infection, inflammation in the urethra is more manifest, than in isolated during these infections. Combined bacterial and viral infections of the genitourinary organs in male is characterized by a more pronounced effect on the individual factors of systemic and local immune response (functional activity of neutrophils) than in the case of an isolated flow of chlamydial, mycoplasma or HPV-infection.

**Keywords:** human papillomavirus infection in male, the immune response, bacterial-viral infection.

---

---

## ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ СТАТУС КЛЕТОК МОНОЦИТАРНО-МАКРОФАГАЛЬНОГО ЗВЕНА ИММУНИТЕТА У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ АДЕНОИДИТОМ, ОСЛОЖНЕННЫМ ЭКССУДАТИВНЫМ СРЕДНИМ ОТИТОМ

Кологривова Е. Н.<sup>1,2</sup>, Плешко Р. И.<sup>1,2</sup>, Щербик Н. В.<sup>1,2</sup>,  
Староха А. В.<sup>1,2</sup>, Шевцова Н. М.<sup>1</sup>, Ситникова А. В.<sup>1</sup>,  
Аргунова Н. А.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Сибирский государственный медицинский университет; <sup>2</sup>Томский филиал  
ФГБУ «Научно-клинический центр оториноларингологии ФМБА», Томск, Россия

Исследовано содержание моноцитов периферической крови и макрофагов в назальном смыве у детей с хроническим аденоидитом, ассоциированным с экссудативным средним отитом. В моноцитах определяли активность миелопероксидазы и щелочной фосфатазы, в назальном смыве – концентрацию IFN- $\gamma$ , IL-10 и IL-18. Показано, что у больных с осложненным течением аденоидита клетки моноцитарно-макрофагального звена функционируют в режиме усиления провоспалительной и цитотоксической активности. Регулирующее влияние макрофагов на другие эффекторные механизмы иммунной защиты слизистой носоглотки ослаблено. Результаты исследования свидетельствуют о важной роли нарушений функциональной активности макрофагов в патогенезе хронического аденоидита и экссудативного отита.

**Ключевые слова:** моноциты, макрофаги, хронический аденоидит, отит.

Экссудативный средний отит (ЭСО) – хроническое воспаление среднего уха, заканчивающееся накоплением экссудата позади барабанной перепонки без признаков острого воспаления и приводящее к формированию тугоухости звукопроводящего характера. Наи-

более частой причиной тубарной дисфункции может быть хронический аденоидит (ХА) [1]. В зоне хронического воспаления происходит накопление макрофагов за счет эмиграции моноцитов из кровеносного русла, а также за счет мобилизации тканевых макрофагов. Защитную функцию макрофаги реализуют путем фагоцитоза, а также через продукцию провоспалительных и противовоспалительных цитокинов, и с помощью секреции лизосомальных ферментов. Согласно современным представлениям, с учетом функциональной активности можно выделить две субпопуляции макрофагов: М1-клетки, обладающие провоспалительными свойствами, и М2-клетки, играющие доминирующую роль в подавлении иммунных реакций и ремоделировании тканей. При рассмотрении патогенетических особенностей заболеваний с воспалительным компонентом макрофаги заслуживают самого серьезного внимания и представляют собой перспективную терапевтическую мишень с целью коррекции возникающих нарушений.

**Цель работы** – исследовать функциональный статус клеток моноцитарно-макрофагального звена иммунитета у больных хроническим аденоидитом, осложненным экссудативным средним отитом.

Обследовано 48 детей в возрасте от 3 до 7 лет с хроническим аденоидитом. Первую клиническую группу составили 24 пациента с неосложненным течением ХА, во вторую клиническую группу вошли 24 пациента, у которых на фоне ХА развился ЭСО. В качестве контрольной группы были обследованы 16 относительно здоровых детей без хронических воспалительных процессов на слизистой дыхательных путей. Материалом исследования послужили периферическая кровь, мазки-отпечатки со слизистой носовой полости и назальный смыв. В периферической крови и на мазках-отпечатках со слизистой носа производили подсчет относительного количества моноцитов. Цитохимически в моноцитах крови определяли содержание кислой фосфатазы (КФ) по методу Goldberg-Barka (1962) и миелопероксидазы (МПО) по методу Gracham-Knoll (1958). Результаты оценивали полуколичественным методом с использованием принципа Астальди; результат выражали в виде среднего цитохимического коэффициента (СЦК). Методом иммуноферментного анализа в назальном смыве определяли концентрацию

цитокинов, регулирующих функциональную активность макрофагов: интерлейкина (IL)-18, IL-10 и интерферона (IFN)- $\gamma$ . Все исследования проводились с информированного согласия родителей. Критический уровень значимости при статистической обработке результатов исследования принимался, равным 0,05.

Оценивая содержание моноцитов в периферической крови у детей с хроническим аденоидитом, мы не выявили статистически значимых отличий от контрольной группы. Между клиническими группами также не обнаружено различий по этому показателю. Анализ цитохимических параметров показал, что СЦК, отражающий содержание МПО в цитоплазме моноцитов периферической крови, повышен у пациентов с осложненным течением ХА (0,78 (0,7–0,8), по сравнению с детьми первой клинической группы (0,65 (0,3–0,7);  $p=0,006$ ) и здоровыми (0,67 (0,6–0,9);  $p=0,004$ ). Повышение активности внутриклеточной МПО в моноцитах крови указывает на увеличение в циркуляции содержания незрелых форм моноцитов, обладающих при этом усиленной микробицидностью и неспецифической цитотоксичностью. Известно, что по мере созревания клеток моноцитарного ряда число пероксидазопозитивных гранул в цитоплазме клеток снижается, и, превращаясь в тканевые макрофаги, клетки теряют часть своей цитотоксической активности [2]. Значимых различий между сравниваемыми группами по содержанию КФ в моноцитах крови мы не выявили.

Содержание макрофагов в мазках-отпечатках со слизистой носа было существенно повышено у детей, больных аденоидитом, осложненным ЭСО (9,0 (3,25–16,25))%, по сравнению со здоровыми (1,5 (1,0–2,75))%;  $p=0,002$ ) и детьми с неосложненным аденоидитом (6,0 (2,0–10,75))%;  $p=0,004$ ), что, вероятно, обусловлено усилением их миграционной активности. Привлечению и активации рекрутированных макрофагов может способствовать IFN- $\gamma$ , обнаруженный нами в назальном смыве у большого числа больных с ЭСО (в 33% проб), что значимо отличалось от группы здоровых (6%,  $p=0,043$ ). У детей с неосложненным ХА IFN- $\gamma$  был выявлен в 17% проб. Следует отметить, что IL-10, обладающий противовоспалительной активностью, с высокой частотой выявлялся в назальном смыве у здоровых (21%) и очень

редко – у пациентов с осложненным течением хронического аденоидита (8%).

В назальном смыве больных, страдающих сочетанной патологией (ХА и ЭСО), нами также выявлено значимое снижение концентрации IL-18, по сравнению с группой контроля (49 (35–114) пг/г-белка и 90 (80–262) пг/г-белка соответственно,  $p=0,01$ ), и детьми с не осложненным течением аденоидита (222 (91–313) пг/г-белка;  $p=0,006$ ). Известно, что IL-18 – один из важнейших цитокинов, продуцируемых макрофагами на ранних стадиях воспалительных иммунных ответов [3]. Под влиянием этого цитокина возрастает продукция других провоспалительных медиаторов, которые опосредованно вовлекают в иммунные реакции Т-лимфоциты, НК, нейтрофилы, дендритные клетки и др. Ослабление локальной продукции IL-18 свидетельствует о нарушении иммунорегуляторной функции макрофагов при осложненном течении ХА.

Таким образом, при ХА, ассоциированном с ЭСО, клетки моноцитарно-макрофагального звена функционируют в режиме ослабления

иммунорегуляторной способности и усиления провоспалительной и цитотоксической активности. Нарушение функций проявляется уже на стадии циркуляции в системном кровотоке. В очаге хронического воспаления (слизистая носоглотки) под действием локально продуцируемых цитокинов (IFN- $\gamma$ ) окончательно формируется провоспалительный M1-профиль макрофагов. Вероятно, M1-макрофаги в значительной степени способствуют формированию воспалительного экссудата, который приводит к нарушению вентиляционной и дренажной функции слуховой трубы у пациентов с ЭСО на фоне ХА.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Оториноларингология. Национальное руководство / В.Т. Пальчун.– М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009.– 960 с.
2. Плехова Н.Г. / Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.– 2006.– №6.– С. 89-96.
3. Yoo J. K. et al. / Journal of Immunology.– 2005.– vol. 175.– № 12.– P. 8280-8286.

### THE FUNCTIONAL STATUS OF MONOCYTES-MACROPHAGES IN CHILDREN WITH ADENOIDITIS AND OTITIS MEDIA WITH EFFUSION

Kologrivova E. N.<sup>1,2</sup>, Pleshko R. I.<sup>1,2</sup>, Sherbik N. V.<sup>1,2</sup>,  
Starocha A. V.<sup>1,2</sup>, Shevtcova N. M.<sup>1</sup>, Sitnicova A. V.<sup>1</sup>, Argunova N. A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Siberian state medical university; <sup>2</sup>Tomsk branch "Scientific Clinical Center of Otorhinolaryngology of FMBA", Tomsk, Russia

The quantity of monocytes in peripheral blood and macrophages in nasal lavage were investigated in children with adenoiditis and otitis media with effusion. Myeloperoxidase and alkaline phosphatase activity were determined in monocytes, the concentrations of IFN- $\gamma$ , IL-10 and IL-18 were determined in nasal lavage. It was found, that inflammatory and cytotoxic activity of monocytes and macrophages was amplified. Regulatory influence of the macrophages on the other immune effector mechanisms of the nasal mucosa was decreased. These results illustrate the significant role of the disorders of macrophages functions in the pathogenesis of adenoiditis and otitis media with effusion.

## СОДЕРЖАНИЕ CD34<sup>+</sup>-КЛЕТОК У СПОРТСМЕНОВ

Колупаев В.А.<sup>1</sup>, Сашенков С.А.<sup>2</sup>, Долгушин И.И.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ФГБОУ ВПО Уральский государственный университет физической культуры;

<sup>2</sup>ГБОУ ВПО Южно-Уральский государственный медицинский университет,  
Челябинск, Россия

Проведен анализ результатов наблюдений содержания CD34<sup>+</sup>-клеток у спортсменов с высоким уровнем аэробных физических нагрузок осенью и зимой (квалифицированные лыжники-гонщики и лыжники-гонщики массовых разрядов) и с повышенным уровнем аэробных нагрузок весной и летом (квалифицированные скороходы и скороходы-разрядники). Показано, что уровень содержания CD34<sup>+</sup> в крови у лыжников и скороходов массовых разрядов во время подготовительного периода, приходящегося на лето и зиму – соответственно, был значительно выше, чем у лыжников и скороходов высокой квалификации. При этом динамика содержания этих клеток у спортсменов массовых разрядов по сезонам была более выражена, чем у квалифицированных лыжников-гонщиков и скороходов.

*Ключевые слова:* моноциты, нейтрофилы, CD34<sup>+</sup>-клетки, фагоцитарная активность, физические нагрузки.

Состояние системы крови играет важную роль при обеспечении высокой двигательной активности в широком диапазоне воздействия факторов и условий внешней среды, поэтому изучение закономерностей динамики содержания полипотентных стволовых гемопоэтических клеток у квалифицированных атлетов является актуальным и своевременным.

**Цель исследования:** изучение содержания CD34<sup>+</sup>-клеток в периферической крови у спортсменов с разной динамикой аэробных физических нагрузок в цикле года.

**Организация исследования.** Проведен анализ результатов наблюдений содержания CD34<sup>+</sup>-клеток в периферической крови у 4-х групп спортсменов с преимущественно аэробным энергообеспечением мышечной деятельности, но с разной динамикой физических нагрузок в цикле года: с высоким уровнем аэробных физических нагрузок осенью и зимой (квалифицированные лыжники-гонщики и лыжники-гонщики массовых разрядов) и с повышенным уровнем аэробных нагрузок весной и летом (квалифицированные скороходы и скороходы-разрядники). Изучение содержания CD34<sup>+</sup>-клеток осуществляли методом иммунофенотипирования посредством моноклональных антител анти-CD34 серии ИКО («Медбиоспектр» г. Москва) моноклональной фракции лейкоцитов, выделенной на двойном градиенте плотности фиколл-ворографин.

Исследование фагоцитарной, лизосомальной и НСТ-активности нейтрофилов (Нф) и моноцитов (Мц) периферической крови у спортсменов выполнено по традиционной методике с определением содержания и количества фагоцитирующих клеток в периферической крови, фагоцитарного индекса, фагоцитарного числа и суммарного показателя фагоцитарной активности, индекса лизосомальной активности, содержания и количества фагоцитов в спонтанном и индуцированном НСТ-тесте [Тотолян А.А., Фрейдлин И.С., 2000]. Лабораторные исследования выполнены на базе НИИ иммунологии Южно-Уральского государственного медицинского университета Министерства здравоохранения РФ (ректор ЮУГМУ – заслуженный деятель науки РФ, член-корреспондент РАН, д.м.н., профессор И.И. Долгушин).

**Результаты исследования.** Средний уровень содержания CD34<sup>+</sup> в периферической крови у спортсменов был значительно выше, чем у неспортсменов и составлял  $9,00 \pm 0,38\%$  или  $0,125 \pm 0,007 \times 10^9/\text{л}$ . В общей совокупности обследованных спортсменов наблюдались статистически значимые колебания по сезонам средних значений абсолютного содержания CD34<sup>+</sup> в периферической крови с повышением уровня этих клеток зимой по сравнению с весной и осенью. При этом содержание CD34<sup>+</sup>-клеток отрицательно коррелировало с уровнем ак-

тивности и интенсивности фагоцитоза Нф, показателями фагоцитарной активности Мц, а также содержанием С1- и С5-компонентов комплемента в крови и положительно связано с уровнем лизосомальной активности Нф.

Средний уровень содержания CD34<sup>+</sup> у скороходов различной квалификации не имел существенных отличий, тогда как у лыжников-гонщиков массовых разрядов уровень относительного и абсолютного содержания этих клеток был значительно выше, чему квалифицированных лыжников-гонщиков. Значимых различий по величине содержания CD34<sup>+</sup> у лыжников-гонщиков и скороходов одинаковой квалификации не выявлено.

Летом в начале подготовительного периода относительное и абсолютное содержание CD34<sup>+</sup>-клеток у лыжников-разрядников было достоверно выше ( $P < 0,02$ ), чем у квалифицированных лыжников-гонщиков. У скороходов аналогичным образом зимой в подготовительный период относительное содержание CD34<sup>+</sup>-клеток у разрядников было значительно ( $P < 0,05$ ) выше, чем у квалифицированных скороходов.

В группе квалифицированных спортсменов с высоким уровнем аэробных физических нагрузок в осенне-зимний период (лыжники-гонщики) статистически значимых изменений содержания CD34<sup>+</sup>-клеток в цикле года не отмечалось. У лыжников-разрядников летом наблюдалось значительное повышение относительного и абсолютного содержания CD34<sup>+</sup>-клеток по сравнению с весной. Достоверное увеличение абсолютного содержания CD34<sup>+</sup>-клеток у этих спортсменов зимой в соревновательный период было связано с повышением содержания лейкоцитов в крови. В группе спортсменов-разрядников с высоким уровнем

аэробных физических нагрузок весной и летом динамика средних значений содержания CD34<sup>+</sup>-клеток в периферической крови скороходов в цикле года характеризовалась уменьшением относительного и абсолютного содержания этих клеток летом в соревновательный период по сравнению с другими сезонами. У квалифицированных скороходов в отличие от разрядников уровень абсолютного содержания CD34<sup>+</sup> значимо не менялся, а процентное содержание этих клеток существенно снижалось летом.

Содержание CD34<sup>+</sup>-клеток в периферической крови у представителей «зимнего» вида спорта отрицательно коррелировало с уровнем показателей фагоцитарной активности Мц (обе квалификационные группы), а у лыжников-гонщиков массовых разрядов ещё и с уровнем лизосомальной активности Нф и активности фагоцитоза этих клеток. У представителей «летнего» вида спорта содержание CD34<sup>+</sup> отрицательно коррелировало с уровнем лизосомальной активности Нф (скороходы-разрядники), тогда как у квалифицированных скороходов было отрицательно связано с уровнем спонтанного НСТ-теста нейтрофильных гранулоцитов.

Таким образом, у атлетов с аэробным энергообеспечением мышечной деятельности уровень содержания CD34<sup>+</sup> в крови у лыжников и скороходов массовых разрядов во время подготовительного периода, приходящегося на лето и зиму – соответственно, был значительно выше, чем у лыжников и скороходов высокой квалификации. При этом динамика содержания этих клеток у спортсменов массовых разрядов по сезонам была более выражена, чем у квалифицированных лыжников-гонщиков и скороходов.

## CONTENT OF CD34<sup>+</sup>-CELLS IN ATHLETES

Kolupaev V.A.<sup>1</sup>, Sashenkov S.L.<sup>2</sup>, Dolgushin I.I.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Ural State University of Physical Culture; <sup>2</sup>South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russia

The analysis of the results of observations content CD34<sup>+</sup>-cells in athletes with a high level of aerobic physical activity in autumn and winter (skilled skiers and skiers mass categories) and with elevated levels of aerobic exercise in spring and summer (qualified walkers and runners-arresters). It is shown that the level of CD34<sup>+</sup> in the blood of skiers and walkers mass categories in the preparatory period, attributable to the summer and winter – respectively, was significantly higher than that of skiers and walkers qualifications. The dynamics of the contents of these cells in athletes massive discharges seasonal was more pronounced than that of skilled skiers and walkers.

*Keywords:* monocytes, neutrophils, CD34<sup>+</sup>-cell, phagocytic activity, exercise.

## ПОКАЗАТЕЛИ ЛЕЙКОГРАММЫ И ЛЕЙКОЦИТАРНЫЕ ИНДЕКСЫ ПРИ КОРРЕКЦИИ МАГНИЕВОГО ДЕФИЦИТА НАНОДИСПЕРСНОЙ ФОРМОЙ ОРОТАТА МАГНИЯ

Комиссаров В. Б.<sup>1</sup>, Сметанина М. В.<sup>1</sup>, Чучкова Н. Н.<sup>2</sup>,  
Канунникова О. М.<sup>3</sup>, Кормилина Н. В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ГБОУ ВПО Ижевская государственная медицинская академия, Ижевск; <sup>2</sup>ФГБУН Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, Екатеринбург; <sup>3</sup>ФГБУН Физико-технический институт УрО РАН, Ижевск, Россия

В условиях формирования магниевого дефицита у крыс и его коррекции фармакопейной и нанодисперсной (механоактивированной) формой оротата магния было проведено исследование скорости восстановления уровня магния в сыворотке, состава белой крови и лейкоцитарных индексов. Показано, что дефицит магния сопровождается увеличением количества гранулоцитов и лимфоцитов, снижением числа лимфоцитов, изменением лейкоцитарных индексов, свидетельствующих о наличии воспалительной реакции и развивающейся эндогенной интоксикации. Установлено, что при введении нанодисперсной формы магния оротата повышение уровня магния в сыворотке, эффективность восстановления показателей белой крови, стабилизация лейкоцитарных индексов идет более выражено.

*Ключевые слова:* дефицит магния, лейкоцитарная формула, лейкоцитарные индексы, нанодисперсный (механоактивированный) магния оротат.

Магниевый дефицит оказывает влияние на формирование различной патологии, обуславливая нарушение иммунного статуса [1], что требует обязательной коррекции. Апробированные, старые лекарственные вещества не всегда так эффективны, как хотелось бы, поэтому задача разработки новых лекарственных форм, повышения их терапевтической эффективности на основе известных препаратов, очень актуальна. Для модификации физических и химических свойств лекарственных веществ, определяющих их биологическую активность и устойчивость, применим метод механической активации [3, 5].

В связи с этим нами была поставлена цель – сопоставить показатели лейкограммы и лейкоцитарных индексов крови на введение фармакопейного и механоактивированного оротата магния в условиях экспериментального моделирования магниевого дефицита.

**Методы.** Для получения механоактивированной формы лекарственного препарата проводилась термообработка кристаллического оротата магния (термостатирование при температуре 115–125 °С в течение 40–60 мин) с последующим измельчением в измельчителем активаторном устройстве (шаровая

планетарная мельница), что привело к переходу оксо-формы исходного оротата в метастабильную гидроксид-форму, изменению изомерной структуры оротата (таутомерному превращению), что сопровождалось большей растворимостью и скоростью растворения в водных растворах и липидах, изменением взаимодействия разных таутомеров с белками клеточной мембраны [2, 4]. Лабораторных животных разделили на группы: интактный контроль (10 крыс) – без воздействия; экспериментальная группа (№ 20). После моделирования у животных дефицита магния (30 мг/кг 1% фуросемида ежедневно в течение 10 дней), крыс разделили на 2 группы, которые получали необработанный (фармакопейный) магния оротат – первая группа (ФМО); вторая – механоактивированный магния оротат (ММО). Препараты вводились внутривентрикулярно, через зонд в дозе 50 мг/кг массы в течение 6-и дней. У животных с индуцированным дефицитом магния (ДМ) забирали кровь на 11-й день, на 3-й и 6-й дни после начала коррекции изучаемыми препаратами. В крови лабораторных крыс регистрировали содержание магния (ммоль/л) в сыворотке (оборудование и тест-системы «ARKREY» (Япония), прово-



дили общий анализ крови (общее содержание лейкоцитов  $10^9/\text{л}$ ) с расчетом лейкоцитарной формулы и подсчетом лейкоцитарных индексов. Данные обрабатывались статистически с использованием стандартного пакета Statistica-6.

**Основные результаты.** В результате 10-дневного курса инъекций фуросемида количество магния в сыворотке крови лабораторных животных снизилось в 1,94 раза (с  $1,75 \pm 0,08$  в контроле до  $0,902 \pm 0,18$  ммоль/л при ДМ,  $p \leq 0,05$ ). В дальнейшем, при введении нанодисперсного магния оротата количество магния в плазме крови повышается на 64% в сравнении с группой ДМ ( $1,12 \pm 0,10$  ммоль/л), хотя за исследуемый период времени не достигает контрольных значений. У крыс, получавших необработанный вариант магния оротата, этот показатель составил  $0,855 \pm 0,05$  ммоль/л. Быстрая реакция организма на прием гидроксид-формы (ММО) коррелирует с более высокой растворимостью и скоростью растворения этой формы по сравнению с исходным препаратом.

У животных с гипомагниемией наблюдались признаки системной иммуновоспалительной реакции. Так, общее количество лейкоцитов при ДМ увеличивается на 51,43% (с  $11,2 \pm 1,81$  до  $16,96 \pm 5,001$ ,  $p \leq 0,05$ ) по сравнению с интактной группой, главным образом, за счет гранулоцитов ( $3,55 \pm 0,08$  – контроль vs  $5,4 \pm 0,07$ ,  $p \leq 0,1$  – ДМ). Количество лимфоцитов повышается в 1,7 раз ( $5,9 \pm 1,3$  – контроль vs  $10,02 \pm 1,3$  – ДМ,  $p \leq 0,05$ ); количество моноцитов ( $1,75 \pm 0,08$  vs  $1,54 \pm 0,05$ ) незначительно снижается. Введение магния оротата нормализует цитологические показатели белой крови в группе экспериментальных животных, получавших нанодисперсный препарат, тогда как в группе с введением необработанного лекарственного вещества остается несколько повышенным количество лейкоцитов ( $12,3 \pm 0,9$ ,  $p \leq 0,1$ ), снижены моноциты ( $1,1 \pm 0,11$ ,  $p \leq 0,05$ ), отмечается незначительный лимфоцитоз ( $7,03 \pm 1,9$ ,  $p \leq 0,1$ ).

Рассчитываемый на основе данных индекс соотношения лимфоцитов и моноцитов (ИСЛМ) отражает баланс между этими клетками и характеризует взаимоотношение афферентного и эффекторного звеньев иммунологического процесса. В условиях магниевого дефицита повышение индекса обусловлено, главным образом, развивающимся лимфоци-

тозом (ИСЛМ в контроле  $3,37 \pm 0,3$ , при ДМ –  $6,62 \pm 0,7$  усл.ед.), тогда как при введении магния оротата высокие значения индекса обусловлены моноцитопенией (ИСЛМ:  $6,4 \pm 1,0,1$  и  $6,39 \pm 0,51$  усл.ед. – ФМО и ММО экспериментальной группам соответственно). Возможно, этот процесс обусловлен усиленной миграцией моноцитов в ткани.

Лимфоцитарный индекс (ЛИ) – это отношение количества (в %) лимфоцитов к нейтрофилам (палочкоядерные, сегментоядерные), отражающее взаимоотношения звеньев гуморального и клеточного иммунитета. Резкое его повышение отмечается в группе с ДМ ( $1,89 \pm 0,06$  vs  $2,41 \pm 0,05$  усл.ед.), с нормализацией в группе ММО ( $1,95 \pm 0,04$  усл.ед.), но не ФМО ( $2,15 \pm 0,12$  усл.ед.).

Индекс Кребса представляет собой отношение общего количества нейтрофилов к лимфоцитам и косвенно характеризует активность фагоцитарных реакций и факторов специфического иммунитета, а также их участие в поддержании общей реактивности организма. У интактных крыс этот индекс составляет  $0,53 \pm 0,017$ , понижается до  $0,42 \pm 0,03$  ( $p \leq 0,05$ ) у крыс с ДМ и восстанавливается только в группе с введением нанодисперсного ( $0,51 \pm 0,015$  усл.ед.), но не фармакопейного магния оротата ( $0,47 \pm 0,02$  усл.ед.,  $p \leq 0,05$ ). Лимфоцитарно-гранулоцитарный индекс, незначительно повышенный при ДМ, нормализуется в группах с введением магния оротата ( $16,62 \pm 2,5$ ;  $18,52 \pm 1,5$ ;  $15,73 \pm 3,3$ ;  $16,86 \pm 3,5$  в контроле, ДМ, ММО, ФМО экспериментальных группам соответственно).

Не меняется в экспериментальных группах ЛИИ – лейкоцитарный индекс интоксикации, характеризующий активность процессов фагоцитоза и пролиферации нейтрофилов и представляющий собой соотношение уровня нейтрофилов и суммы лимфоцитов, моноцитов и эозинофилов.

Таким образом, гипомагниемия у крыс вызывает эндогенную интоксикацию, развивающуюся в условиях дефицита магния, что отражается в изменении состава белой крови и лейкоцитарных индексах, характеризующих, в целом, ответную реакцию иммунной системы. Наиболее эффективно восстановление ряда параметров иммунного гомеостаза происходит при введении нанодисперсного магния оротата, что, возможно, связано с изменением свойств ФМО при его механоак-

тивации, в результате которой формируются таутомерные модификации оротат-аниона (2), что сопровождается повышенной гидро- и липофильностью в сравнении с исходным препаратом, изменением механизмов взаимодействия оротат-аниона с клеткой.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. M. Tam, S. Gómez, M. González-Gross, A. Marcos// European Journal of Clinical Nutrition.– 2003.–57, р.1193-1197.
2. Аксенова В. В., Михайлова С. С., Собенникова М. В. и др. Патент на изобретение RU 2541 806 С. 1. Опубликовано 20.02.2015, Бюл.№ 5.
3. Душкин А. В., Сунцова Л. П., Халиков С. С. // Фундаментальные исследования.– 2013.– № 1.– с. 448-457.
4. Карбань О. В., Канунников М. М., Чучкова Н. Н., Савинова Н. В. и др. // Химическая физика и мезоскопия. 2014, т. 16.– № 4.– с. 546-556.
5. Фундаментальные основы механической активации, механосинтеза и механохимических технологий / под ред. Е. Г. Авакумова.– Новосибирск: Изд-во СОРАН.– 2009.– 342 с.

### INDICATORS OF LEUKOGRAM AND LEUKOCYTE INDICES IN THE CORRECTION OF MAGNESIUM DEFICIENCY BY NANODISPERSED FORM OF MAGNESIUM OROTATE

Commissarov V. B.<sup>1</sup>, Smetanina M. V.<sup>1</sup>, Chuchkova N. N.<sup>2</sup>,  
Kanunnikova O. M.<sup>3</sup>, Kormilina N. V.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Izhevsk state medical Academy, Izhevsk; <sup>2</sup>Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch RAS, Yekaterinburg; <sup>3</sup>Physical-Technical Institute, Ural Branch RAS, Izhevsk, Russia

Under the formation of magnesium deficiency in rats and its correction with pharmacopoeial and nanosized (mechanically activated) form of magnesium orotate, a study was conducted against the rate of recovery of magnesium levels in the serum, the composition of the white blood count and leukocyte indices. It is shown that magnesium deficiency is accompanied by an increase in the number of granulocytes and lymphocytes, a decrease in the number of lymphocytes, changes in leukocyte indices, indicating the presence of inflammatory reactions and developing endogenous intoxication. It is established that following the introduction of nanodispersed form of magnesium orotate the increase of the level of magnesium in serum, the efficiency of recovery in the parameters of the white blood cells, and stabilization of leukocyte indices are more pronounced.

*Key words:* magnesium deficiency, leukocyte formula, leukocyte indices, nanosized (mechanically activated) magnesium orotate.

### ИММУННЫЕ ДИСФУНКЦИИ ПРИ ПСИХОЛОГИЧЕСКОЙ ДЕЗАДАПТАЦИИ У ПАЦИЕНТОК С ЦЕРВИКАЛЬНЫМИ ИНТРАЭПИТЕЛИАЛЬНЫМИ НЕОПЛАЗИЯМИ

Кононова И. Н.

ГБОУ ВПО Уральский государственный медицинский университет  
Минздрава России, Екатеринбург, Россия

Проведенное исследование иммунного и психологического статуса 306 пациенток с CIN выявило взаимосвязь между психологической дезадаптацией, иммунными дисфункциями и степенью цервикальной дисплазии. Введение в комплексную терапию иммуномодулирующего препарата Имунофан способствовало нормализации показателей местного иммунитета, ускорению репаративных процессов шейки матки, что позволяет рекомендовать этот метод в комплексной терапии CIN.

*Ключевые слова:* иммунный статус, психологический статус, цервикальные интраэпителиальные неоплазии.

Цервикальные интраэпителиальные неоплазии (CIN) занимают значительное место в амбулаторной гинекологии, составляя от 10,7 до 38,8% [1], требуют своевременной диагностики, адекватной терапии, реабилитации с целью профилактики прежде всего онкопатологии [2]. Общеизвестно, что CIN сопровождаются нарушением иммунного гомеостаза на местном уровне, и при этом у 33% пациенток даже после проведенного лечения происходит рецидивирование предракового процесса [3]. Поскольку для пациентки возникновение предракового процесса является психоэмоциональным стрессом, реакция на который у каждой женщины индивидуальна, как и изменения гомеостаза, происходящие на этом фоне, изучение психологического статуса имеет значение для оптимизации терапии [4].

**Цель исследования.** Оценить взаимосвязи между иммунными дисфункциями и психологической дезадаптацией у пациенток с CIN с последующей коррекцией.

**Материалы и методы.** Проведено обследование и лечение 306 пациенток с гистологически верифицированным диагнозом «цервикальная интраэпителиальная неоплазия I, II, III ст.». Все пациентки разделены на 3 группы по степени неопластического поражения: I группу составили 109 пациенток с CIN I ст., во II-ю группу вошли 102 женщины с CIN II, III-ю – 95 пациенток с CIN III. В группу контроля (IV) вошли 102 относительно здоровые женщины без патологии шейки матки. Для изучения местного иммунитета были определены уровни цитокинов IL-1 $\beta$ , IL-8, TNF, IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10, IL-6, АИТ IFN $\alpha$ , VEGF, sIgA. Исследование проводилось с помощью тест-систем «Вектор Бест» (Новосибирск) методом ИФА. Для изучения психологического статуса использовалась Личностная шкала проявлений тревоги Дж. Тейлор, изучение нейротизма с помощью опросника EPI Г. Айзенка. Экспериментальный материал, полученный в результате исследования обрабатывался с использованием программы SPSS.

**Результаты и обсуждение.** При анализе типов иммунного реагирования у пациенток I группы наиболее часто встречался воспалительный тип (ДИО,95=32,5÷59,6), характеризующий активность нейтрофильных гранулоцитов и свидетельствующий об активации макрофагально-фагоцитарного звена кле-

точного иммунитета. Изучение параметров местного иммунитета во II группе свидетельствовало о преимущественном иммунодефицитном типе иммунного реагирования. При этом воспалительный тип встречался значительно реже, чем в III группе (P2-3= 0,002), а противовоспалительный тип – значительно чаще, чем в I, IV, V группах (P2-1=0,042, P2-3=0,023, P2-4=0,049, P2-5=0,001), что свидетельствует о снижении воспалительного потенциала у пациенток с данным типом иммунного реагирования и увеличении повреждающего действия на цервикальный эпителий противовоспалительного компонента. В III группе наблюдалось еще большее угнетение иммунитета, проявляющееся в снижении всех изучаемых параметров, что объясняется постоянным напряженным функционированием в течение длительного времени и истощением ресурсов, приведшим впоследствии к морфологическим изменениям в шейке матки. Следует отметить положительную сильную коррелятивную связь между ростом диспластического процесса в шейке матки и показателями VEGF (r=0,876).

Анализ психологического статуса обследованных пациенток продемонстрировал отрицательную сильную корреляционную связь между снижением параметров иммунного реагирования и достоверным повышением тревожного компонента в структуре личности пациенток с CIN II и CIN III с повышением реактивности на внутренние и внешние раздражители по сравнению с данными женщин группы контроля (для CIN II RR=5,971 U=4,571 при p=0,001, для CIN III RR=6,102 U=3,812 при p=0,000). При анализе интро-/экстраверсии выявлена высокая положительная корреляционная связь между показателем интровертированности, снижением параметров иммунного статуса и степенью цервикальной неоплазии (r=+0,759). Проведенный анализ относительного риска интро/экстравертированности продемонстрировал протекторный эффект экстравертированности и триггерный – интровертированности пациенток I группы (RR=2,439, U=4,178 при p=0,007) и II группы (RR=3,398, U=3978 при p=0,000), при этом имелась средняя корреляционная отрицательная связь между показателем экстраверсии, иммунодефицитным состоянием и степенью цервикального интраэпителиального поражения (r= -0,54).

На основании проведенного исследования разработан дифференцированный подход к иммуномодулирующей терапии CIN пептидным регулятором иммунитета – имунофаном с различными способами введения препарата. В частности, внутримышечное и подкожное введение имунофана (50мкг ежедневно однократно курс лечения 10 инъекций) осуществлялось при комплексной терапии CIN I, II, III при изменении системного иммунитета, при сочетании CIN с экстрагенитальными инфекционными хроническими заболеваниями. Свечная форма (по 100мкг однократно вагинально, курс лечения 10 суппозиторий) применялась при изменении локального иммунитета с сохраненным системным иммунным статусом, цервикальном поражении легкой степени. При HSIL (CIN II, III) назначалось комплексное воздействие, как системное, так и местное. Альтернативным вариантом при любом поражении цервикального эпителия являлось физиофармакологическое воздействие кавитированными растворами имунофана 50мкг в 50мл физиологического раствора ежедневно 3–5 дней, что привело к снижению рецидивирования CIN в 3,5 раз, осложнений после деструкции – в 3,7 раза, снижении тревожного компонента в 5 раз [5].

Таким образом, имеется взаимосвязь между психологической дезадаптацией, иммунными дисфункциями и степенью цервикальной дисплазии. Введение в комплексную терапию иммуномодулирующего препарата Имунофан способствует нормализации показателей местного иммунитета, элиминации вируса папилломы человека, ускорению репаративных процессов шейки матки, что позволяет рекомендовать этот метод в комплексной терапии CIN.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Профилактика рака шейки матки: сб. науч. тр. / Под ред. Г. Т. Сухих, В. Н. Прилепской. – Москва: МЕДпресс-информ, 2012. – 190 с.
2. Обоскалова Т. А., Кононова И. Н., Севостьянова О. Ю., Берзин С. А. Уральский медицинский журнал. – 2014. – № 4 (118). – с. 69-72.
3. Кононова И. Н., Ворошилина Е. С. Российский иммунологический журнал. – 2014. – Т. 8 (17), № 3. – С. 809-811.
4. Кононова И. Н., Рогачева Т. В. Медицинская психология в России: электрон. науч. журн. – 2015. – N 1 (30) [Электронный ресурс]. – URL: <http://mprj.ru>.
5. Гизингер О. А., Кононова И. Н., Летяева О. В. – Врач. – 12.2014. – С. 70-73.

#### IMMUNE DYSFUNCTION IN PSYCHOLOGICAL MALADJUSTMENT IN PATIENTS WITH CERVICAL INTRAEPITHELIAL NEOPLASIAS

Kononova I. N.

*Ural state medical University, Yekaterinburg, Russia*

The study of the immune and psihologicheskogo status 306 patients with CIN revealed a relationship between psychological maladjustment, immune dysfunction and the degree of cervical dysplasia. Introduction to complex therapy immunomodulating medication Imunofan contributed to the normalization of local immunity, acceleration of reparative processes in the cervix, which allows us to recommend this method in complex treatment of CIN.

*Keywords:* immune status, psychological status, cervical intraepithelial neoplasia.

## ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛОВ И ГУМОРАЛЬНЫЙ ИММУНИТЕТ ПРИ РАЗНЫХ ФОРМАХ СЕБОРЕЙНОГО КЕРАТОЗА

Костенко Е. И.

ГБОУ ВПО Южно-Уральский государственный университет,  
Челябинск, Россия

Вне зависимости от формы себорейного кератоза установлено снижение функциональной активности нейтрофилов, в целом отражающее снижение функциональных возможностей фагоцитирующих клеток крови, что в совокупности определяет снижение эффекторного потенциала фагоцитарных реакций у пациентов с себорейным кератозом. Со стороны параметров гуморального иммунитета не обнаружено значимых изменений показателей.

*Ключевые слова:* себорейный кератоз, активность нейтрофилов, гуморальный иммунитет.

Себорейный кератоз (СК) описан впервые в конце XIX века. Согласно международной гистологической классификации опухолей кожи «Патология и генетика опухолей кожи» (Pathology and Genetics of Skin Tumors, 2008) себорейный кератоз относится к доброкачественным эпителиальным опухолям, разновидности акантом. Данные об эпидемиологии СК в нашей стране малочисленны [1]. Себорейный кератоз одинаково часто встречается у мужчин и женщин, преимущественно пожилого и старческого возраста, при этом наибольшее поражение кожи СК отмечается на закрытых участках, подверженных механическому воздействию [2]. Одной из важных функций кератиноцитов является участие в иммунных реакциях, синтезе IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-3, IL-8, IL-15, IL-19, способности к антигенной презентации, запуску сигнальных путей иммунной реакции и продукции провоспалительных медиаторов [3].

**Цель исследования:** изучить характеристику функциональной активности фагоцитов и состояние гуморального звена иммунитета у пациентов с разными формами себорейного кератоза.

**Материалы и методы.** Основную группу исследования составил 91 пациент с себорейным кератозом. Из них 62 женщины (68,1%), мужчин – 29 (31,8%) человек. Возраст больных

с СК на момент проведения исследования составил от 40 лет до 75 лет (средний  $59,2 \pm 6,4$ ). Согласно клиническим критериям пациенты с СК были разделены на 3 группы: 1 группа – 18 пациентов с пятнистой формой СК; 2 группа – 12 пациентов с СК с папулезной формой СК; 3 группу составил 61 пациент с пятнисто-папулезной формой СК. Контрольную группу составили 30 условно здоровых лиц (средний возраст  $63,8 \pm 5,4$  года). Верификацию СК проводили с использованием дерматоскопа HEINE 20 (Германия). Материалом для исследования являлась венозная кровь, которую забирали утром, натощак. Исследование фагоцитарной способности нейтрофилов включало определение следующих показателей: активности фагоцитоза нейтрофилов (АФН), интенсивности фагоцитоза нейтрофилов (ИФН), определение фагоцитарного числа (ФЧ), НСТ-активности нейтрофилов: спонтанной (НСТ сп.), индуцированной (НСТ инд.), НСТ-индекса активности нейтрофилов: спонтанной (НСТ инд. сп.), индуцированной (НСТ инд. инд.), лизосомальную активность стандартными, общепринятыми методами. Достоверность различий оценивали в рамках программы Statistica StatSoft 6.0, согласно критериям непараметрической статистики (U-test Mann-Whitney).

**Результаты и обсуждение.** Начиная со зрелых костно-мозговых форм, нейтрофилы

не меняют своего фенотипа после миграции в ткани, в отличие от моноцитов, являющихся незрелыми предшественниками макрофагов. Со стороны клеток миелоидного ростка кроветворения не зафиксировано изменений численности общего количества лейкоцитов, сегментоядерных нейтрофилов, базофилов и эозинофилов в крови пациентов с различными формами себорейного кератоза. Изучение активности фагоцитоза нейтрофилов показало его достоверное снижение при всех формах СК, в сравнении с контрольной группой. Снижение показателя АФ может наблюдаться при изменении функциональных возможностей фагоцитов, вследствие различных причин: нарушения рецепции сигнала, его проведения, предшествующей гиперстимуляции, иммунокомплексной патологии. Ключевым моментом для запуска процесса интернализации чужеродных частиц фагоцитом является распознавание поверхностных детерминант на поверхности фагоцита, при этом, блокада отдельных групп распознающих молекул, сопровождается снижением активности фагоцитоза. Также нами установлено снижение показателя интенсивности фагоцитоза нейтрофилов во всех группах пациентов с СК. Показатели ИФ и ФЧ отражают поглотительную способность фагоцита и степень выраженности воспалительных изменений в зоне повреждения. Поглощение объекта фагоцитоза, является одной из форм клеточного движения, при этом, взаимодействуя с плазматической мембраной объект фагоцитоза, индуцирует образование псевдоподий, сливающихся между собой. Для этого необходима рецептор-зависимая активация клетки-фагоцита, тесно связанная с процессом опсонизации. Снижение ИФ может также наблюдаться при наличии хронического воспалительного процесса в организме и снижении интенсивности процессов презентации и неспецифической опсонической кооперации.

Изучение процессов кислородзависимой биоцидности, связанной с активацией молекулярного кислорода, системой миелопероксидазы, оксидом азота и вторичными оксиметаболитами, проведенное нами в классическом НСТ-тесте нейтрофилов, показало повышение на уровне тенденции, не достигающей степени статистической достоверности, спонтанной НСТ активности и индекса спонтанной активности НСТ во всех группах

с себорейным, что может отражать низкую напряженность эффекторных кислородзависимых механизмов врожденного иммунитета. Способность к продукции активных форм кислорода, выявляемая с помощью НСТ-теста, является одним из универсальных свойств врожденного иммунитета. Ключевым событием образования активных форм кислорода является сборка ферментативного комплекса НАДФН-оксидазы. Кроме того, нами зафиксировано снижение на уровне тенденции, не достигающей степени статистической достоверности, показателя индуцированной НСТ-активности нейтрофилов, что указывает на снижение резерва функциональной способности нейтрофилов у пациентов с разными формами СК. Кислородзависимая биотоксичность определяется непосредственно факторами, преформированными в гранулах фагоцитов (катионными белками (дефенсинами), лизоцимом, лактоферрином). Оценка лизосомальной активности нейтрофилов показала тенденцию к снижению показателя в группе пациентов с СК.

Показанные нами изменения функциональной активности нейтрофилов крови у пациентов с различными формами СК в целом отражают снижение функциональных возможностей фагоцитирующих клеток крови, что в совокупности определяет снижение эффекторного потенциала фагоцитарных реакций у пациентов с себорейным кератозом.

Изучение параметров гуморального звена иммунитета не показало значимых изменений со стороны количества циркулирующих иммунных комплексов и системы комплемента, работающей по принципу ограниченного протеолиза (СН50). Уровень иммуноглобулина М, отвечающего за реализацию первичного иммунного ответа, в отличие от иммуноглобулинов А и G у пациентов с пятнистой формой СК был достоверно повышен, в сравнении с контрольной группой.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ламоткин И. А., Малиновский Н. А. // Военно-медицинский журнал. – 2010. – Т. 331, № 2. – С. 72.
2. Молочков В. А. [и др.] // Российский журнал кожных и венерических болезней. – 2012. – № 5. – С. 29-32.
3. Соловьев А. М. // Вестник дерматологии и венерологии. – 2011. – № 5. – С. 146-151.

## NEUTROPHIL FUNCTIONAL ACTIVITY AND HUMORAL IMMUNITY IN VARIOUS FORMS OF SEBORRHEIC KERATOSIS

Kostenko E. I.

Medical University South Ural State University, Chelyabinsk, Russia

Regardless of the form of seborrheic keratosis found decreased functional activity of neutrophils, reflecting the decline in the overall functionality of phagocytic blood cells, which together determine the capacity of phagocytic effector reduction reactions in patients with seborrheic keratosis. On the part of the parameters of humoral immunity found no significant changes in indicators.

*Keywords:* seborrheic keratosis, activity of neutrophils, humoral immunity.

---

---

## ИССЛЕДОВАНИЕ В СИСТЕМЕ *IN VIVO* ИММУНОРЕГУЛЯТОРНЫХ ЭФФЕКТОВ *RHODOCOCCLUS* ГЛИКОЛИПИДА

Кочина О. А.<sup>1</sup>, Баева Т. А.<sup>1</sup>, Куюкина М. С.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН;

<sup>2</sup>Пермский государственный национальный исследовательский университет,  
Пермь, Россия

В настоящей работе представлены данные о влиянии гликолипидного биосурфактанта *Rhodococcus ruber* ИЭГМ 231 на антителогенез, пролиферативную активность спленоцитов и продукцию цитокинов IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, INF- $\gamma$  *in vivo*. Установлено, что препарат снижал количество антителообразующих клеток в селезенке, угнетал пролиферативную активность спленоцитов в стимулированных культурах, однако на продукцию IL-4 и INF- $\gamma$  ГЛБ оказывал активирующий эффект. Гликолипид оказывал угнетающее влияние на секрецию IL-10 и TNF- $\alpha$  в зимозан-стимулированных культурах макрофагов. Совместное инкубирование препарата с перитонеальными макрофагами вызвало подавление как спонтанной, так и индуцированной зимозаном ЛЗХЛ.

*Ключевые слова:* *Rhodococcus ruber*, биосурфактант, гликолипиды, иммунорегуляция.

**Актуальность и цель работы.** Микробные гликолипиды – это комплексы амфифильных молекул, синтезируемых бактериями. Они состоят из моно- и дисахаров, соединённых с  $\alpha$ -разветвленными  $\beta$ -гидроксилированными миколовыми кислотами. Подобные гликолипиды являются характерными компонентами клеточной стенки таких родов бактерий как *Dietzia*, *Rhodococcus*, *Nocardia*, *Gordona* и *Mycobacteria*. Доказано, что они проявляют противоопухолевую, антимикробную, противовирусную и противораковую активность. Однако большинство из них являются токсичными и патогенными для человека и животных благодаря наличию длинных разветвленных углеводородных цепей. В связи

с этим является актуальным поиск непатогенных продуцентов гликолипидных биосурфактантов, обладающих иммуномодулирующей активностью. В лаборатории алканотрофных микроорганизмов ИЭГМ УрО РАН был выделен нетоксичный гликолипидный биосурфактантный комплекс (ГЛБ) *Rhodococcus ruber* ИЭГМ 231, изучена его структура и способность стимулировать иммунный ответ в системе *in vitro*.

**Цель настоящей работы** – исследование влияния биосурфактанта *Rhodococcus ruber* ИЭГМ 231 на антителообразование, спонтанную и стимулированную пролиферацию и цитокиновую продукцию спленоцитами мыши *in vivo*, а также секрецию активных форм

кислорода, про- и противовоспалительных цитокинов перитонеальными макрофагами мыши *in vivo* при внутрибрюшинном введении препарата.

**Материалы и методы.** Эксперименты были проведены на белых беспородных мышамсамцах. Животные содержались в стандартных условиях лабораторного вивария, получая комбинированный корм и воду *ad libitum*. Мышам внутрибрюшинно вводили ГЛБ в трех концентрациях 25, 50, 100 мг/кг. Контрольной группе вводился физиологический раствор. Выведение из эксперимента осуществлялось по правилам, принятым Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (Страсбург, 1986 г.).

Для оценки гуморального звена иммунитета через час после введения биосурфактанта животных иммунизировали ЭБ по 200 мкл внутрибрюшинно в дозе  $5 \times 10^9$  кл/мл. На 5-е сутки, на пике иммунного ответа, определялось количество АОК в селезенке методом локального гемолиза в геле агарозы.

Для оценки пролиферативной активности спонтанных и стимулированных Кон А (20 мкг/мл) спленоцитов клетки культивировали в 96-луночных планшетах в полной питательной среде. Концентрация клеток в культуре составляла  $5 \times 10^5$  клеток/луночку. Активность пролиферации оценивали через 72 часа по интенсивности встраивания 3H-метилтимидина. Результаты оценивались при помощи жидкостного сцинтилляционного счетчика. Для анализа спонтанной и стимулированной цитокиновой секреции спленоциты ( $25 \times 10^5$  клеток/луночку) культивировали в течение 24-часов (IL-2, IL-1 $\beta$ ) и 48-часов (IL-4, INF- $\gamma$ ) в 24-луночных планшетах. Супернатанты собирали в пробирки «Эппендорфф» и замораживали при температуре 20°C. Определение концентрации цитокинов проводили с использованием иммуноферментных тест-систем «R&D Systems, США».

Для анализа продукции IL-1 $\beta$ , IL-10 и TNF- $\alpha$ , перитонеальные макрофаги ( $0,5 \times 10^6$  клеток/луночку) инкубировали в течение 24 часов. Затем снимали надосадок и замораживали для хранения. Оценку секреции цитокинов осуществляли с использованием иммуноферментных наборов.

Оценку микробицидной активности осуществляли при помощи реакции ЛЗХЛ, которую проводили в 96-луночных иммунологиче-

ских планшетах с оптическим дном. Для этого в планшет в спонтанные культуры раскапывали суспензию клеток, люминол ( $C=10^{-5}$  М) и раствор Хенкса. Для индукции респираторного взрыва вместо солевого раствора дополнительно вносили опсонизированный зимозан (150 мкг/мл). Регистрацию результатов проводили на спектрофотометре Тесла в течение часа с 5 минутным интервалом в относительных световых единицах (RLU).

Статистическую обработку результатов проводили с использованием двухфакторного дисперсионного анализа и LSD-критерия Фишера.

**Результаты и обсуждение.** Установлено, что введение препарата в дозах 50 и 100 мг/кг приводило к выраженному угнетению гуморального иммунного ответа. Количество АОК в селезенке мышей уменьшалось более чем в два раза. Максимальный эффект наблюдался при использовании ГЛБ в концентрации 100 мг/кг.

Гликолипид в концентрациях 50 и 100 мг/кг статистически значимо угнетает пролиферацию в стимулированных культурах спленоцитов. В спонтанных культурах спленоцитов наблюдается тенденция к стимуляции пролиферативных процессов, но статистически значимого влияния ГЛБ зафиксировано не было. В результате проведенных исследований показано, что в культурах спленоцитов нет статистически значимого эффекта ГЛБ на продукцию IL-1 $\beta$  и IL-2, но при этом он достоверно стимулирует продукцию IL-4 и INF- $\gamma$  в стимулированных культурах в концентрациях 100 и 25 мг/кг соответственно. Анализ уровня цитокинов в спонтанных культурах перитонеальных макрофагов показал, что препарат статически значимо не модулирует их секрецию, однако оказывает достоверное угнетающее влияние на продукцию IL-10 и TNF- $\alpha$  в зимозан-стимулированных культурах.

Препарат оказывал статистически значимый подавляющий эффект на продукцию свободных радикалов как в спонтанных, так и в стимулированных культурах макрофагов. Максимальное по продолжительности и силе угнетение было зарегистрировано в дозе 25 мг/кг.

Таким образом, гликолипид, выделенный из непатогенного штамма *Rhodococcus ruber* ИЭГМ 231, обладает иммунорегуляторной активностью, однако в связи с разнонаправленностью оказываемых эффектов нуждается в дальнейшем изучении.



## RESEARCH OF IMMUNOREGULATORY EFFECTS OF *RHODOCOCCLUS* GLYCOLIPID *IN VIVO* SYSTEM

Kochina O. A.<sup>1</sup>, Baeva T. A.<sup>1</sup>, Kuyukina M. S.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, UB RAS; <sup>2</sup>Perm State National Research University, Perm, Russia

This paper provides a data on the influence of glycolipid biosurfactant of *Rhodococcus ruber* IEGM 231 on antibody-forming and proliferation activity of splenocytes and IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, INF- $\gamma$  cytokine synthesis *in vitro*. We have determined that biosurfactant reduced a number of antibody-forming cells in spleen and repressed splenocytes proliferation activity in stimulated culture. However, the preparation activated the IL-4 and INF- $\gamma$  production. Glycolipid inhibited IL-10 and TNF- $\alpha$  secretion in zymosan stimulated cultures of macrophages. Co-incubation of biosurfactant with peritoneal macrophages caused both spontaneous and zymosan-induced LDCL repression.

---

---

## ИССЛЕДОВАНИЕ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНОЙ АКТИВНОСТИ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ В ДИНАМИКЕ ЛЕЧЕНИЯ ПОСТИНФАРКТНОГО КАРДИОСКЛЕРОЗА

Краснова Л. В., Беленюк В. Д., Гвоздев И. И., Савченко А. А.

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера»,  
Красноярск, Россия

Постинфарктный кардиосклероз как одна из форм ишемии имеет исключительную распространенность среди населения РФ. Для комплексного исследования данной проблемы была проанализирована хемилюминесцентная активность нейтрофильных гранулоцитов у больных с постинфарктным кардиосклерозом. Было выявлено значительное снижение эффективности развития кислородного взрыва, активно задействованного в воспалительных процессах, протекающих при данном заболевании относительно контрольных значений.

*Ключевые слова:* нейтрофилы, хемилюминесценция, кардиосклероз.

Кардиосклероз является одним из наиболее распространенных причин смертности, а также временной и стойкой утраты трудоспособности населения в развитых странах мира. В связи с этим, проблема кардиосклероза занимает одно из ведущих мест среди важнейших медицинских проблем XXI века [5]. Для обеспечения всестороннего подхода к данной проблеме, необходимо оценивать активность клеток иммунной системы активно задействованных в развитии воспалительных процессов, протекающих в некротических очагах после инфаркта миокарда [1, 2, 5]. Нейтрофильные гранулоциты являются ключевыми клетками всех воспалительных процессов, протекающих в организме. Зрелые сегментоядерные

нейтрофилы в норме являются основным видом лейкоцитов, циркулирующих в крови человека, составляя от 47% до 72% общего количества лейкоцитов крови [3, 4]. Нейтрофилы способны к фагоцитозу, то есть способны поглощать лишь относительно небольшие чужеродные частицы или клетки. Они способны к внутри- и внеклеточному лизису бактерий за счет образования свободных радикалов в процессе генерации «кислородного взрыва» [3, 4]. На первом этапе «кислородный взрыва» синтезируется супероксидный анион радикал (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), обладающий огромной реакционной способностью – первичная активная форма кислорода (АФК). Далее он подвергается действию ферментов, что ведет к образованию

токсических продуктов кислорода, которые определяются как вторичные АФК и выступают в роли бактерицидных агентов [1, 2, 3]. После фагоцитирования чужеродных частиц нейтрофилы обычно погибают, высвобождая большое количество биологически активных веществ, усиливающих воспаление и хемотаксис иммунных клеток в очаг. Метод хемилюминесценции позволяет обнаружить высоко реакционноспособные радикалы, тем самым оценить интенсивность «кислородного взрыва», скорость его развития в нейтрофильных гранулоцитах [3, 4].

**Целью** нашей работы являлось исследование хемилюминесцентной активности нейтрофильных гранулоцитов в динамике лечения постинфарктного кардиосклероза.

**Материалы и методы.** На базе ФГБНУ «НИИ медицинских проблем Севера» было обследовано 76 пациентов с постинфарктным кардиосклерозом, в возрасте 30-65 лет (средний возраст пациентов составил 46 лет). В качестве контроля обследовано 40 относительно здоровых людей аналогичного возрастного диапазона. Все исследования выполнены с информированного согласия испытуемых и в соответствии с этическими нормами Хельсинкской Декларации 2001 г. Хемилюминесцентное (ХЛ) исследование активности нейтрофилов проводится по ранее разработанным методикам. Исследование спонтанной и зимозан-индуцированной ХЛ гранулоцитов осуществляли с помощью хемилюминесцентного анализатора «CL3606M» (СКТБ «Наука», Красноярск). Результаты хемилюминесцентного анализа оценивали по следующим параметрам: время выхода на максимум ( $T_{max}$ ), максимальное значение интенсивности ( $I_{max}$ ) и площадь под хемилюминесцентной кривой ( $S$ ). Усиление хемилюминесценции, индуцированной зимозаном, оценивали отношением площади индуцированной хемилюминесценции к площади спонтанной ( $S_{инд.}/S_{спонт.}$ ) и определяли как индекс активации. Описание выборки производили с помощью подсчета медианы ( $Me$ ) и интерквартильного размаха в виде 25 и 75 перцентилей ( $C_{25}$  и  $C_{75}$ ). Достоверность различий между показателями независимых выборок оценивали по непараметрическому критерию Манна-Уитни (Mann-Whitney U test). Статистический анализ осуществляли в пакете прикладных программ "Statistica 8.0" (StatSoft Inc., 2007).

**Результаты и обсуждение.** В ходе исследования были получены статистически достоверные данные о понижении площади под кривой спонтанной люминол-зависимой хемилюминесценции ( $p < 0,01$ ) на первой неделе лечения относительно контрольных значений. Достоверных отличий на второй неделе исследования не выявлено. На первой неделе лечения люминол-зависимая хемилюминесценция, индуцированная опсонизированным зимозаном, достоверно снижена ( $p < 0,01$ ) относительно контрольных значений. При исследовании интенсивности и времени выхода на максимум люминол-зависимой спонтанной и индуцированной хемилюминесценции достоверных отличий обнаружено не было. Это указывает на сниженную продукцию АФК, вызванную метаболическим истощением нейтрофильных гранулоцитов у больных с постинфарктным кардиосклерозом. Площадь под кривой люцигенин-зависимой хемилюминесценции на первой неделе значительно снижена ( $p < 0,001$ ) по сравнению с контрольным диапазоном. На второй неделе достоверных отличий по данному параметру обнаружено не было. При оценке индуцированной зимозаном люцигенин-зависимой хемилюминесценции значимых различий между показателями контрольной группы и пациентов с постинфарктным кардиосклерозом не обнаружено. При исследовании времени выхода на максимум было обнаружено значимое снижение люцигенин-зависимой спонтанной хемилюминесценции ( $p < 0,01$ ). Аналогичная картина наблюдалась при исследовании индуцированной зимозаном люцигенин-зависимой хемилюминесценции ( $p < 0,01$ ). На второй неделе лечения достоверные отличия не зафиксированы. В результате исследования интенсивности люцигенин-зависимой спонтанной и индуцированной хемилюминесценции достоверных отличий обнаружено не было. Это указывает на сниженный уровень синтеза супероксидного анион-радикала нейтрофильными гранулоцитами [1, 2]. Выход супероксидного анион-радикала при антигенной стимуляции опсонизированным зимозаном ускорен, что свидетельствует о наличии дополнительных метаболических резервов нейтрофильных гранулоцитов у пациентов с постинфарктным кардиосклерозом.

**Выводы.** В ходе исследования состояния нейтрофильных гранулоцитов у больных с по-

стинфарктным кардиосклерозом установлены изменения их функциональной активности. На первой неделе лечения обнаружено значительное снижение интенсивности «кислородного взрыва» в нейтрофильных гранулоцитах крови. Это указывает на возможное истощение метаболических резервов в клетках, опосредованное спецификой развития данного заболевания. На второй неделе достоверных различий в группе больных с постинфарктным кардиосклерозом не обнаружено, что указывает на развитие компенсаторных процессов и эффективность проводимой терапии.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Савченко А. А. // Сибирское медицинское обозрение, 2012. С. 10.
2. Славинский А. А. // Международный журнал экспериментального образования, 2010. № 7, С. 63-65.
3. Владимиров Ю. А., Проскурнина Е. В. // Успехи биологической химии, 2009. т. 49, С. 341-388.
4. Савченко А. А., Борисов А. Г. Основы клинической иммунометаболической Новосибирск, «Наука», 2012. С. 263.
5. Zhou X., Yun J. L., Han Z. Q. et al. // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 2011. Vol. 300, № 5, P. 1863-1874.

## THE RESEARCH OF CHEMILUMINESCENT ACTIVITY OF NEUTROPHILS DURING THE TREATMENT MYOCARDIAL INFARCTION

Krasnova L. V., Belenyuk V. D., Gvozdyov I. I., Savchenko A. A.

FSSI "Scientific Research Institute of Medical Problems of the North", Krasnoyarsk, Russia

Myocardial infarction as a form of coronary disease has exceptional prevalence among the population of the Russian Federation. For a comprehensive study of the problem was analyzed chemiluminescent activity of neutrophilic granulocytes in patients with postinfarction cardiosclerosis. Showed a statistically significant decrease in the efficiency of oxygen explosion, actively involved in the inflammatory processes that occur in this disease relative to the control values.

*Keywords:* neutrophils, chemiluminescence, cardiosclerosis.

---

## УРОВЕНЬ ИЛ-1 $\beta$ И ФНО $\alpha$ В СУПЕРНАТАНТАХ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР У ДЕТЕЙ С ЮВЕНИЛЬНЫМ ИДИОПАТИЧЕСКИМ АРТРИТОМ И РЕАКТИВНЫМ АРТРИТОМ

Криволапова И. М.<sup>1,2</sup>, Пашнина И. А.<sup>1,2</sup>, Черешнев В. А.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Отдел клинической иммунологии, Областная детская клиническая больница № 3;

<sup>2</sup>Лаборатория иммунологии воспаления, Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, Екатеринбург, Россия

Обследованы дети 6–17 лет с ЮИА (n=57), реактивным артритом (n=12) и условно здоровые дети соответствующего возраста (n=31, контроль). Спонтанную и ФГА-стимулированную концентрацию ИЛ-1 $\beta$  и ФНО $\alpha$  в супернатантах клеточных культур исследовали методом ИФА. Выявлено увеличение спонтанной и стимулированной продукции ФНО $\alpha$  иммунокомпетентными клетками у детей с ЮИА и РеА по сравнению с контролем. Для ИЛ-1 $\beta$  также отмечено увеличение спонтанной продукции у детей с ЮИА и РеА, тогда как синтез этого цитокина при стимуляции митогеном был ниже, чем в контрольной группе.

*Ключевые слова:* цитокины, ювенильный идиопатический артрит, реактивный артрит.

Одной из актуальных проблем современной педиатрии является диагностика и лечение воспалительных заболеваний суставов.

В этой группе заболеваний наиболее распространенным является аутоиммунное поражение суставов – ювенильный идиопатический

артрит (ЮИА) [1]. В настоящее время активно исследуется цитокиновый профиль у детей с ЮИА, также как у взрослых больных с ревматоидным артритом [2, 3]. Определение уровня провоспалительных цитокинов, в частности ИЛ-1 $\beta$  и ФНО $\alpha$ , при ЮИА значимо для оценки активности заболевания, а также эффективности антицитокиновой терапии. [4]. Однако результаты разных авторов, касающиеся определения концентраций цитокинов, противоречивы [3]. Остаются малоизученными особенности цитокиновой продукции при реактивном артрите (РеА) – заболевании суставов, близком к ЮИА по клиническим проявлениям и имеющем в своем патогенезе инфекционную и аутоиммунную составляющие. Наиболее часто концентрации цитокинов определяются в сыворотке крови, реже в синовиальной жидкости, однако, в литературных источниках представлены лишь ограниченные данные о способности иммунокомпетентных клеток к выработке цитокинов при стимуляции *in vitro*.

Целью нашей работы явилось определение спонтанного и стимулированного уровней ИЛ-1 $\beta$  и ФНО $\alpha$  в супернатантах культур клеток цельной крови у детей с ювенильным идиопатическим артритом и с реактивным артритом.

Обследованы дети 6–17 лет с ЮИА (n=57), РеА (n=12) и условно здоровые дети соответствующего возраста без признаков аутоиммунных заболеваний (n=31, контроль). Группу с ЮИА составили дети с полиартритом (n=17) и олигоартритом (n=40). Забор крови для исследований проводился в утренние часы строго натощак. Для определения содержания цитокинов в супернатантах клеточных культур цельную кровь разводили 1:9 глутаминсодержащей средой RPMI-1640 (Пан-Эко, Россия). Разведенную кровь инкубировали по 500 мкл в CO $_2$ -инкубаторе при температуре 37 °C в течение 24 ч в присутствии фитогемагглютина (ФГА) в конечной концентрации 20 мкг/мл и без стимулятора. Концентрацию ИЛ-1 $\beta$  и ФНО $\alpha$  в супернатантах исследовали методом ИФА (Вектор-Бест, Россия). Для оценки значимости различий между группами использовали непараметрический критерий Манна-Уитни, результаты представлены в виде медианы. Статистическая обработка выполнена с использованием программы Statistica 6.0.

При определении спонтанной и стимулированной продукции ИЛ-1 $\beta$  и ФНО $\alpha$  у детей

с олиго- и полиартикулярным вариантами ЮИА различий не обнаружено. Это послужило основанием для объединения всех больных с ювенильным идиопатическим артритом в одну группу. Выявлено статистически значимое увеличение спонтанной продукции ИЛ-1 $\beta$  и ФНО $\alpha$  в группе детей с ЮИА (9,0 пг/мл, p<0,05 и 3,0 пг/мл, p<0,001, соответственно) по сравнению с контрольной группой (2,0 пг/мл и 0,4 пг/мл, соответственно). У детей с реактивным артритом концентрации данных цитокинов также были повышены, хотя достоверные различия с условно здоровыми детьми были обнаружены только для ФНО $\alpha$  (2,5 пг/мл, p<0,05), концентрация ИЛ-1 $\beta$  составила 8,0 пг/мл.

Неоднозначные результаты получены при определении ФГА-стимулированного уровня ИЛ-1 $\beta$  и ФНО $\alpha$ . Стимулированная продукция ИЛ-1 $\beta$  была достоверно ниже у пациентов с ЮИА (375 пг/мл, p<0,01) и РеА (241,5 пг/мл, p<0,05), чем у детей из контрольной группы (555,0 пг/мл). В то же время продукция ФНО $\alpha$  у больных с ЮИА и РеА при стимуляции клеток крови митогеном была существенно увеличена (296,0 пг/мл, p<0,05 и 405,0 пг/мл, p<0,01, соответственно) по сравнению с контролем (250 пг/мл).

Так как наибольшей способностью к продукции данных провоспалительных цитокинов среди клеток крови обладают моноциты [3], то разница между группами потенциально может быть обусловлена содержанием разного количества этих клеток в образцах крови. Но, согласно нашим предварительным исследованиям, у больных с ЮИА и РеА абсолютное количество моноцитов, как и общее количество лейкоцитов, не отличалось от такового у условно здоровых детей.

Таким образом, выявлено увеличение спонтанной и ФГА-стимулированной продукции клетками крови ФНО $\alpha$  у больных с ЮИА и РеА по сравнению с условно здоровыми детьми. Для ИЛ-1 $\beta$  у детей с заболеваниями суставов также отмечены повышенные по сравнению с контролем спонтанные концентрации, тогда как синтез этого цитокина при стимуляции митогеном был ниже, чем у здоровых детей. Выявление высоких спонтанных концентраций ИЛ-1 $\beta$  и ФНО $\alpha$  при ЮИА и РеА свидетельствует о наличии у этих больных предшествующей активации иммунокомпетентных клеток, приводящей к усилению их способно-

сти вырабатывать данные цитокины. Сниженная продукция ИЛ-1 $\beta$  после стимуляции ФГА у больных с ЮИА и РеА по сравнению со здоровыми детьми, указывает на истощение резервов функциональной активности клеток. Нами ранее выявлено, что увеличение количества Т-лимфоцитов, экспрессировавших ранний активационный маркер CD69, в ответ на стимуляцию ФГА у больных с ЮИА и РеА было существенно слабее, чем у здоровых детей [5]. Соответственно, функциональные возможности лимфоцитов крови при воспалительных заболеваниях суставов у детей также были снижены. Однако стимулированная продукция ФНО $\alpha$  при ЮИА и РеА была выше контрольных уровней. Необходимы дальнейшие исследования для выяснения причин, которые приводят к разной интенсивности синтеза исследованных цитокинов при стимуляции. Схожие результаты определения спон-

танной и стимулированной продукции ИЛ-1 $\beta$  и ФНО $\alpha$  при ЮИА и РеА свидетельствуют об общности патогенеза этих заболеваний.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алексеева Е. И., Литвицкий П. Ф. Ювенильный ревматоидный артрит: этиология, патогенез, клиника, алгоритмы диагностики и лечения. ВЕДИ, Москва 2007, 368.
2. Глазанова Т. В., Бубнова Л. Н., Мазуров В. И. Цитокины и воспаление 2002, 1.
3. Федоров Е. С., Салугина С. О., Кузьмина Н. Н. Научно-практическая ревматология 2009, 3, 74-89.
4. Жолобова Е. С., Конопелько О. Ю., Розвадовская О. С., Ельяшевич В. Я., Николаева М. Н. Научно-практическая ревматология 2013, 51 (1), 44-47.
5. Пашнина И. А. Российский иммунологический журнал 2014, Т 8 (17), 4, 965-973.

### THE LEVELS OF IL-1 $\beta$ AND TNF $\alpha$ IN THE SUPERNATANTS OF THE CELL CULTURE IN CHILDREN WITH JUVENILE IDIOPATHIC ARTHRITIS AND REACTIVE ARTHRITIS

Krivolapova I. M.<sup>1,2</sup>, Pashnina I. A.<sup>1,2</sup>, Chereshev V. A.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Regional Child's Clinical Hospital № 1; <sup>2</sup>Institute of Immunology and Physiology Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, Russia

Children with juvenile idiopathic arthritis (n=57), reactive arthritis (n=12) and healthy children (n=31) of 6–17 years old were examined. Spontaneous and FGA-stimulated concentration of IL-1 $\beta$  and TNF $\alpha$  in the supernatants of the cell culture were determined by ELISA. Spontaneous and FGA-stimulated production of TNF $\alpha$  by immunocompetent cells was increased in children with juvenile idiopathic arthritis and reactive arthritis in comparison with control. Spontaneous IL-1 $\beta$  production was also increased in children with joints diseases whereas the stimulated production of this cytokine was decreased in comparison with healthy children.

## ЭКСПРЕССИЯ SEMA4D ИНТАКТНЫМИ И АКТИВИРОВАННЫМИ Т-ЛИМФОЦИТАМИ *IN VITRO*

Куклина Е. М., Данченко И. Ю., Валиева Ю. В.,  
Лопатина В. А.

ФГБУН Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения  
Российской академии наук, Пермь, Россия

Исследована экспрессия семафорина Sema4D (CD100) Т-лимфоцитами периферической крови *ex vivo* и *in vitro*, с одновременной оценкой уровня растворимого Sema4D в супернатантах клеточных культур. Показано, что уровень экспрессии семафорина (Mean Fluorescence Intensity, MFI) на мембране интактных Т-лимфоцитов существенно повышен в культуре клеток по сравнению с таковым *ex vivo*, и имеет обратную корреляцию с уровнем растворимого Sema4D в культуре. В условиях поликлональной активации экспрессия мембранного семафорина на Т-лимфоцитах повышается на начальной стадии и существенно снижается впоследствии – по-видимому, за счет его отщепления от мембраны. Учитывая участие Sema4D-зависимого сигнала в активации лимфоцитов, изменение его экспрессии, по-видимому, играет важную роль в контроле иммунного ответа.

*Ключевые слова:* семафорины, Sema4D, Т-лимфоциты.

Семафорины – семейство молекул, которые содержат филогенетически консервативный “sema”-домен и первоначально были идентифицированы в центральной нервной системе как факторы, участвующие в сигнальных процессах аксонального наведения [1]. В отличие от остальных членов данного семейства, Sema4D, известный также как CD100, впервые был выявлен в иммунной системе [2], и уже позже на основании структурного анализа был отнесен к семафоринам IV класса [1]. Sema4D представляет собой трансмембранный белок, экспрессируемый в иммунной системе преимущественно Т-лимфоцитами и, в существенно меньшей степени – остальными лейкоцитарными популяциями. За счет протеолитического отщепления он может переходить в растворимую форму (soluble Sema4D, sSema4D), сохраняя при этом функциональную активность [3]. Клетки иммунной системы экспрессируют два типа рецепторов для Sema4D – CD72 и плексин В1 [4]. Более того, сам Sema4D может выступать не только в качестве лиганда, но и как рецептор, проводя сигнал в клетку, на которой он экспрессирован. Учитывая, что Sema4D широко представлен в иммунной системе, а рецептор для него, CD72, участвует в реализации антигенного сигнала в В-клетках, данный семафорин, тео-

ретически, должен играть важную роль в контроле активации иммуноцитов. Однако несмотря на то, что и сам Sema4D, и его рецепторы были идентифицированы почти 20 лет назад, четкого понимания механизмов его участия в данных процессах нет до сих пор.

**Цель настоящей работы** – определить экспрессию Sema4D (CD100) Т-лимфоцитами периферической крови *ex vivo*, а также в условиях поликлональной активации *in vitro*, с одновременной оценкой уровня растворимого Sema4D в супернатантах клеточных культур.

В работе исследовали лейкоциты здоровых доноров (средний возраст  $30,6 \pm 1,38$  лет), которые выделяли из гепаринизированной венозной крови центрифугированием в градиенте плотности фиколла-верографина ( $1,077 \text{ г/см}^3$ ). Полученную суспензию мононуклеарных клеток использовали далее для определения экспрессии семафорина Sema4D (CD100) Т-лимфоцитами (CD3<sup>+</sup>4<sup>+</sup>- и CD3<sup>+</sup>8<sup>+</sup>-клетками). Определение проводилось проточной цитометрией с помощью соответствующих моноклональных антител: анти-CD100\*PE (Biolegend), анти-CD3\*PE/Cy7, анти-CD4/CD8\*FITC (Beckman Coulter). При этом оценивали как процент Sema4D-позитивных клеток, так и уровень экспрессии на клетках данного маркера, определяя среднюю интен-

сивность свечения (Mean Fluorescence Intensity, MFI; условные единицы). Наряду с этим, экспрессию Т-лимфоцитами Sema4D определяли после 1- или 18-часового культивирования ( $2 \cdot 10^6$  клеток/мл) в среде RPMI1640 с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки ("Serva"), 300 мкг/мл L-глутамин ("Serva"), 0,01М HEPES ("Sigma") и 100 мкг/мл гентамицин ("Pharmacia", Швеция) при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. В качестве активатора Т-клеток использовали форболмиристатацетат (ФМА, Sigma; 10 нг/мл) и иономицин (Sigma; 2 мкМ). В ряде экспериментов культивирование проводилось в присутствии аутологичной плазмы (1%-, 5%- или 10%-ной) как источника эндогенных протеиназ. Одновременно определяли уровень растворимого Sema4D (sSema4D) в плазме крови, которую получали центрифугированием венозной крови при 3000 об/мин в течение 5 мин, а также в супернатантах клеточной культуры – иммуноферментным анализом (R&D). Статистический анализ проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента.

Установлено, что, несмотря на конститутивную экспрессию семафорина Sema4D (CD100) Т-лимфоцитами как *ex vivo*, так и *in vitro*, уровень экспрессии данной молекулы, определяемый как средняя интенсивность свечения (MFI), повышен на интактных Т-лимфоцитах (CD3<sup>+</sup>-клетках) в 18-часовой культуре:  $97,9 \pm 10,2$  у.е. для Т-клеток *ex vivo* и  $125 \pm 11,9$  у.е. для интактных Т-лимфоцитов в культуре;  $p < 0,05$ . Это повышение было показано как для CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, так и для CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> Т-клеток.

Поликлональная активация Т-лимфоцитов *in vitro* (PMA, 10 мкг/мл, и иономицин, 2 мкМ) вызывала существенные изменения в экспрессии Sema4D, причем направленность изменений зависела от длительности культивирования. На начальном этапе, при 60-минутной инкубации, отмечалось усиление экспрессии Sema4D – как по отношению к данным *ex vivo* (MFI:  $136 \pm 8,45$  у.е. для активированных Т-клеток и  $97,9 \pm 10,2$  у.е. для Т-клеток *ex vivo*,  $p < 0,05$ ), так и в сравнении со спонтанным вариантом (MFI:  $136 \pm 8,45$  у.е. для активированных Т-клеток и  $102 \pm 15,9$  у.е. для интактных Т-клеток в культуре,  $p < 0,05$ ). Однако при 18-часовой инкубации этот показатель, напротив, снижался – в сопоставлении с данными *ex vivo* (MFI:  $81,8 \pm 8,05$  у.е. для активированных Т-клеток и  $97,9 \pm 10,2$  у.е.

для Т-клеток *ex vivo*,  $p < 0,05$ ), со спонтанным вариантом (MFI:  $81,8 \pm 8,05$  у.е. для активированных Т-клеток и  $125 \pm 11,9$  у.е. для интактных Т-клеток в 18-часовой культуре,  $p < 0,05$ ), а также с соответствующим показателем для активированных Т-лимфоцитов при 60-минутной инкубации (MFI:  $81,8 \pm 8,05$  у.е. для активированных Т-клеток и  $136 \pm 8,45$  у.е. для интактных Т-клеток в 18-часовой культуре,  $p < 0,05$ ). Более того, активация Т-клеток в 18-часовой культуре приводила к появлению субпопуляции CD3<sup>+</sup> Т-клеток, не несущих Sema4D ( $4,39 \pm 0,666\%$  от общего количества CD3<sup>+</sup> Т-лимфоцитов для активированных Т-клеток и  $1,16 \pm 0,207\%$  от общего количества CD3<sup>+</sup> Т-лимфоцитов для интактных Т-клеток,  $p < 0,05$ ).

Поскольку известно, что при активации Sema4D способен «слушиваться» с мембраны в результате протеолитического отщепления, переходя в растворимую форму [5], снижение экспрессии семафорина в 18-часовой культуре обусловлено, по-видимому, именно его отщеплением. В связи с этим, мы одновременно оценили уровень экспрессии растворимого Sema4D, sSema4D, в плазме крови и в супернатантах клеточных культур.

Интересно отметить, что в супернатантах 18-часовой культуры интактных Т-лимфоцитов уровень sSema4D был на порядок выше такового в сыворотке (концентрация sSema4D, пмоль/мл: здоровые доноры:  $2,27 \pm 0,014$  – сыворотка,  $29,4 \pm 5,25$  – супернатант 18-часовой культуры интактных Т-клеток,  $p < 0,05$ ). При этом для культуры клеток выявлена обратная корреляция между уровнем экспрессии семафорина на мембране Т-лимфоцитов и его растворимой формы в супернатанте, что указывает на реципрокную связь между мембранной и растворимой формами Sema4D в данной системе. Исходя из этого, логично было ожидать в активированном варианте существенного повышения уровня sSema4D. Однако, вопреки ожиданиям, уровень sSema4D в условиях активации, хотя и демонстрировал тенденцию к повышению, статистически значимо не изменялся по сравнению со спонтанным вариантом (концентрация sSema4D, пмоль/мл:  $29,4 \pm 5,25$  для интактных клеток и  $33,8 \pm 3,76$  для активированных,  $p > 0,05$ ). Достоверной корреляции между экспрессией мембранной и растворимой формы семафорина в активированном варианте также

не выявлено. Связано это, возможно, с тем, что при активации интенсивно идут два противоположных процесса – выход семафорина и его отщепление, а также, возможно, интернализация мембранной формы Sema4D, и эти процессы накладываются друг на друга, не позволяя выявить взаимосвязи мембранного и растворимого продукта.

Культивирование клеток в присутствии аутологичной плазмы (1%- , 5%- или 10%-ной) как потенциального источника матриксных металлопротеиназ, участвующих в протеолитическом отщеплении семафорина от мембраны, не выявило статистически значимых изменений в уровне экспрессии Sema4D на мембране интактных Т-лимфоцитов, но показало повышение этого показателя на фоне 10%-ной сыворотки в случае активации. Очевидно, в плазме присутствуют факторы, усиливающие экспрессию Sema4D на мембране или стабилизирующие ее, а продукция матриксных металлопротеиназ или иных ферментов, осуществляющих отщепление семафорина от мембраны, обеспечивается

самими лимфоцитами в культуре, и уровень данных молекул в плазме существенного значения не имеет.

В целом, нами показано повышение уровня экспрессии семафорина Sema4D интактными Т-лимфоцитами в культуре, а также интенсивное отщепление этой молекулы от мембраны как в спонтанном варианте, так и в случае клеточной активации, что может иметь место *in vivo* при ответе Т-лимфоцитов на антиген.

Работа поддержана грантом РФФИ (проект № 15–04–05694).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Goodman C. S., Kolodkin A. L., Luo Y. et al. Cell 1999, 97, 551-552.
2. Bougeret C., Mansur IG., Dastot H. et al. Immunol. 1992, 148, 318-323.
3. Delaire S., Billard C., Tordjman R. et al. J. Immunol. 2001, 166, 4348-4354.
4. Kumanogoh A., Watanabe C., Lee I. et al. Immunity 2000, 13, 621-631.
5. Wang X., Kumanogoh A., Watanabe C. et al. Blood 2001, 97, P. 3498-3504.

### SEMA4D EXPRESSION BY INTACT AND ACTIVATED T LYMPHOCYTES *IN VITRO*

**Kuklina E. M., Danchenko I. Yu., Valieva Yu. V., Lopatina V. A.**

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

The expression of semaphorin Sema4D (CD100) by peripheral blood T lymphocytes *ex vivo* and *in vitro* has been studied, with the simultaneous determining of soluble Sema4D level in cell culture supernatants. The level of semaphorin expression (Mean Fluorescence Intensity, MFI) by intact T lymphocytes was shown to increase substantially in cell culture in comparison with the same indication *ex vivo*, and have reversed correlation with the level of soluble Sema4D in culture. Upon polyclonal activation the expression of membrane semaphorin on T lymphocytes increases in early stage, and decreases considerably later – seems due to their cleavage from cell membrane. Taking into account the involvement of Sema4D-dependent signaling in lymphocyte activation, the changing of its expression seems to play important role in the control of immune response.



## ГУМОРАЛЬНЫЙ ИММУНИТЕТ У ДЕТЕЙ С ПЕЧЕНОЧНЫМИ ФОРМАМИ ГЛИКОГЕНОВОЙ БОЛЕЗНИ

Курбатова О. В.<sup>1</sup>, Сурков А. Н.<sup>2</sup>, Закиров Р. Ш.<sup>2</sup>, Полякова С. И.<sup>2</sup>,  
Мирошкина Л. В.<sup>2</sup>, Самохина И. В.<sup>2</sup>, Измайлова Т. Д.<sup>2</sup>, Семенова Г. Ф.<sup>2</sup>,  
Никитин А. В.<sup>2</sup>, Фрейдлин Е. В.<sup>2</sup>, Мельничук О. С.<sup>2</sup>,  
Семикина Е. А.<sup>2</sup>, Петричук С. В.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ФГБНУ НЦАГиП имени ак. В. И. Кулакова МЗ РФ; <sup>2</sup>ФГБНУ «Научный центр здоровья детей», Москва, Россия

В работе представлены сведения о состоянии гуморального звена иммунитета у 57 детей с печеночными формами гликогеновой болезни (ГБ), из них с I типом – 22 ребенка, с III типом – 16 детей, с VI типом – 19 детей. У пациентов с ГБ, независимо от типа, абсолютное количество В-лф было снижено в 35% случаев, в 40% соответствовало возрастному референсному интервалу, а в 26% случаев было повышено. Анализ интенсивности энергетических процессов в В-лимфоцитах выявил выраженные изменения активности СДГ: наблюдалась обратная зависимость между содержанием В-лимфоцитов и активностью СДГ в них. У большинства пациентов с ГБ выявлено снижение концентрации IgG и нормальное содержание IgA и IgM относительно показателей возрастной нормы. Полученные результаты свидетельствуют о снижении функции гуморального звена иммунитета у детей с ГБ, которое, с нашей точки зрения, определяется, в основном, наличием митохондриальной дисфункции в популяциях В-лф, а не изменением их абсолютного количества.

**Ключевые слова:** гуморальный иммунитет, иммуноглобулины, В-клетки, гликогеновая болезнь, сукцинатдегидрогеназа, дети.

**Актуальность и цель работы.** Гликогеновая болезнь (ГБ) – группа наследственных болезней, характеризующихся избыточным накоплением гликогена с нормальной или измененной структурой в различных органах и тканях, чаще в печени и мышцах [1]. Возникновение ГБ обусловлено дефектами ферментов, участвующих в распаде гликогена. К печеночным формам ГБ относятся I, III и VI типы, наиболее тяжело клинически протекает I тип заболевания. Патология сопровождается хронической гипогликемией, приводящей к метаболической декомпенсации. Для пациентов с ГБ характерны клинические признаки гуморально-эффektorного иммунодефицита: частые бактериальные инфекции верхних дыхательных путей и ЛОР-органов, кожи и подкожной жировой клетчатки, желудочно-кишечного тракта [2]. Ранее нами были выявлены изменения в составе Т-лимфоцитов у детей с ГБ: увеличение количества Т-хелперов, регуляторных Т-лимфоцитов и Th17-лимфоцитов, прогрессирующие с возрастом [3]. В связи

с этим, представляет большой интерес комплексная оценка функциональной активности гуморального иммунитета у детей с ГБ. Цель работы – оценить состояние гуморального звена иммунной системы у пациентов с печеночными формами ГБ.

**Пациенты и методы.** За период с 2010 по 2014 гг. в ФГБНУ «НЦЗД» в динамике было обследовано 57 детей с ГБ, из них с I типом – 22 ребенка (N наблюдений=61), с III типом – 16 детей (N=28), с VI типом – 19 детей (N=42). Возраст пациентов с ГБ варьировал от 1 года до 17 лет, медиана возраста 7,6 лет (4,1–10,8). Группу сравнения составили 48 условно здоровых ребенка, сопоставимых по возрасту. Иммунологические исследования включали определение относительного и абсолютного числа В-лимфоцитов (В-лф), популяций B1 (CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>) и B2 (CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>CD5<sup>-</sup>) лимфоцитов; определение активности сукцинатдегидрогеназы (СДГ) – основного фермента цикла Кребса и II этапа дыхательной цепи митохондрий

в популяциях В-лф; определение содержания иммуноглобулинов классов G, A, M (IgG, IgA и IgM) в сыворотке крови. Иммуноцитохимический анализ крови выполняли на проточном цитофлуориметре FC500 (BC, США) [4]. Концентрацию Ig определяли иммунотурбидиметрическим методом на приборе UniCel DxС800 (BC, США). В связи с возрастными особенностями иммунного статуса детей [5], количество В-лф и концентрации Ig были пересчитаны в процентах отклонения от соответствующего возрастного референсного интервала. Статистическую обработку полученных результатов выполняли с помощью пакета программы Statistica 6.0. Данные об активности СДГ, измеряемой в усл.ед., представлены в виде медианы (нижняя-верхняя квартиль). Достоверность полученных результатов оценивали с помощью критерия Манна-Уитни. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

**Результаты.** У пациентов с ГБ, независимо от типа, абсолютное количество В-лф было снижено в 35% случаев, в 40% соответствовало возрастному референсному интервалу, а в 26% случаев было повышено. Процентное распределение пациентов по отклонению количества В-лф (снижение – соответствие референсному интервалу – повышение) отличалось при разных типах ГБ и составляло при I типе: 31%-22%-47%; при III типе: 43%-43%-14%; при VI типе: 29%-57%-14% соответственно. Анализ абсолютного числа В1-лф выявил снижение в 13% случаев, соответствие возрастному референсному интервалу в 50% и повышение в 37% случаев, причем существенных различий между типами ГБ выявлено не было. Абсолютное число клеток В2-лф было снижено в 12% случаев, находилось в пределах возрастных референсных интервалов в 40% и было повышено в 48% случаев. При этом повышение количества В2-лф было наиболее характерно для I типа ГБ и было выявлено в 63% случаев, что существенно выше, чем при III типе (25%) и при VI типе (36%) ( $p < 0,01$ ).

Анализ интенсивности энергетических процессов в В-лимфоцитах выявил выраженные изменения активности СДГ, отличающиеся у пациентов с разными типами ГБ. При I типе заболевания активность СДГ в популяции В-лф была снижена на 22% ( $p < 0,05$ ), при VI типе – на 16% ( $p < 0,05$ ), при III типе достоверно не отличалась от группы сравне-

ния. Активность СДГ отличалась у пациентов со сниженным, нормативным и повышенным количеством В-лф. Наблюдалась обратная зависимость между содержанием В-лимфоцитов и активностью СДГ в них: у пациентов с низким количеством В1-лф активность СДГ в них была повышена и составила 136,7 (83,8–176,6), у пациентов с нормальным количеством В1-лф – 79,1 (59,3–93,2), у пациентов с повышенным содержанием В1-лф – 67,3 (50,2–91,5) относительно группы сравнения – 107,8 (101,8–129,2). Активность СДГ у детей со сниженным количеством В1-лф была выше, чем у пациентов с повышенным и нормативным количеством В1-лф ( $p < 0,01$ ). У пациентов с низким количеством В2-лф активность СДГ в них составила 74,6 (64,4–90,7) с нормальным количеством В2-лф – 58,6 (47,1–77,8), с повышенным уровнем В2-лф – 58,1 (41,5–76,4) относительно группы сравнения – 78,8 (67,1–95,4). У пациентов с повышенным содержанием В2-лф активность СДГ была достоверно ниже, чем при низком содержании В2-лф ( $p < 0,01$ ). При выделении из общего числа больных ГБ группы пациентов у которых количество В1-лф и В2-лф соответствовало референсному интервалу (21 наблюдение из 131) было показано, что активность в этих популяциях была достоверно снижена и составила 71,9 (59,3–81,1) в популяции В1-лф относительно группы сравнения 107,8 (101,8–129,2) ( $p < 0,05$ ) и 57,1 (45,9–74,3) в популяции В2-лф (группа сравнения – 78,8 (67,1–95,4),  $p < 0,05$ ). Таким образом, у пациентов с ГБ наблюдалось изменение количества как В1-лф, так и В2-лф. Повышение уровня В-лф при I типе ГБ связано, в большей степени, с увеличением количества В2-лф. При оценке функциональной активности В-лф у пациентов с ГБ выявлено снижение активности СДГ в популяции на фоне повышенного или нормального их количества, при этом снижение количества В-лф сопровождалось повышением активности СДГ в них. Полученные данные могут свидетельствовать о компенсаторном повышении активности фермента в ответ на снижение абсолютного числа клеток.

Анализ содержания Ig показал, что концентрация IgG у большинства пациентов с ГБ была снижена (70% наблюдений), а ее повышение наблюдалось лишь у 10% обследованных нами детей. Было выявлено, что содержание IgG было снижено у 52% пациентов с I типом,

у 82% пациентов с III типом и у всех пациентов с VI типом ГБ. Повышение концентрации IgG было характерно только для I типа заболевания и отмечалось у 20% пациентов с этим типом. У 70% пациентов с ГБ содержание IgA не выходило за пределы референсных значений, у 30% пациентов наблюдалось увеличение данного показателя. Детальный анализ изменений IgA при разных типах заболевания показал повышение его концентрации у 50% пациентов с I типом, у 25% с III типом и у 7% с VI типом ГБ. Концентрация IgM не выходила за пределы референсных значений в 90% случаев, у 10% пациентов наблюдалось увеличение данного показателя. Повышенное содержание IgM выявлено у 15% пациентов с I типом, у 8% пациентов с III типом и 4% пациентов с VI типом. У большинства пациентов с ГБ выявлено снижение концентрации IgG и нормальное содержание IgA и IgM относительно показателей возрастной нормы. Корреляционный анализ не выявил зависимости концентрации IgG и количества В-лф. Однако у пациентов с высокими концентрациями IgG активность СДГ в популяциях В-лф была достоверно выше, чем у пациентов с низкими концентрациями IgG. В популяции В1-лф ак-

тивность СДГ: ГБ – 91,3 (59,8–134,4), группа сравнения – 56,6 (49,2–86,5),  $p < 0,05$ ; в популяции В2-лф: ГБ – 64,9 (50,5–105,7), группа сравнения – 49,4 (39,9–76,4),  $p < 0,05$ .

**Заключение.** Полученные результаты свидетельствуют о снижении функции гуморального звена иммунитета у детей с ГБ, которое, с нашей точки зрения, определяется, в основном, наличием митохондриальной дисфункции в популяциях В-лф, а не изменением их абсолютного количества.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Баранов А.А., Намазова-Баранова Л.С., Сурков А.Н., Потапов А.С., Баканов М.И. и др. Гликогеновая болезнь у детей. ПедиатрЪ, Москва 2012.
2. Lin L.J, Wang Y.C., Liu X.M. Chin Med J 2015, 128 (3), 310-315.
3. Курбатова О.В., Мирошкина Л.В. и др. Российский иммунологический журнал 2014, 8 (3), 331-334.
4. Измайлова Т.Д., Радыгина Т.В., Петричук С.В. и др. Российский педиатрический журнал 2007, 1, 11-13.
5. Топтыгина А.П., Семикина Е.Л., Копыльцова Е.А., Алешкин В.А. Медицинская иммунология 2012, 14 (4-5), 289-294.

#### CHARACTERISTICS OF HUMORAL IMMUNITY IN CHILDREN WITH HEPATIC FORM OF GLYCOGEN STORAGE DISEASE

Kurbatova O.V.<sup>1</sup>, Surkov A.N.<sup>2</sup>, Zakirov R. Sh.<sup>2</sup>, Polyakova S.I.<sup>2</sup>, Miroshkina L.V.<sup>2</sup>, Samokhina I.V.<sup>2</sup>, Izmailova T.D.<sup>2</sup>, Semenova G.F.<sup>2</sup>, Nikitin A.V.<sup>2</sup>, Freidlin E.V.<sup>2</sup>, Melnichuk O.S.<sup>2</sup>, Semikina E.L.<sup>2</sup>, Petrichuk S.V.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>FSBI "Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology" Ministry of Healthcare of the Russian Federation; <sup>2</sup>FSBI "Scientific Centre of Children Health" under the Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, Russia

We examined 57 children with hepatic form of GSD. Distribution of children by disease types was: 22 – children with GSD type- I, 16 – children with GSD type-III, 19 – children with GSD type-VI. In patients with GSD the absolute number of B- lymphocytes was reduced in 35% of cases, 40% were consistent with age-related reference interval, and in 26% of cases had increased. Analysis of the intensity of energy processes in the B-lymphocytes revealed pronounced changes in the activity of succinate dehydrogenase (SDH): there was an inverse relationship between the content of B-lymphocytes and the activity of SDH in them. Most patients with GSD showed a reduction in the concentration of IgG and normal levels of IgA and IgM relative to age norms. The results indicate a decrease in the function of humoral immunity in children with GB, which, from our point of view, is determined mainly by the presence of mitochondrial dysfunction in populations B-lymphocytes, and not the change in their absolute number.

## СУБПОПУЛЯЦИОННАЯ СТРУКТУРА ЛИМФОЦИТОВ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ИНФЕКЦИИ У МЫШЕЙ, ВЫЗВАННОЙ ВАРИАНТАМИ ОДНОГО ШТАММА ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА

Мотузова О. В.<sup>1</sup>, Ахматов Э. А.<sup>2</sup>, Хоменков В. Г.<sup>2</sup>, Ахматова Н. К.<sup>2</sup>,  
Лебединская О. В.<sup>3</sup>, Карганова Г. Г.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБНУ «Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М. П. Чумакова», Москва; <sup>2</sup>ФГБНУ «НИИ вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова», Москва; <sup>3</sup>ГБОУ ВПО «Пермский государственный медицинский университет имени академика Е. А. Вагнера» МЗ РФ, Пермь, Россия

В настоящее время патогенетические механизмы клещевого энцефалита, в том числе взаимодействие вируса с иммунной системой, активно изучаются, но все еще остаются не до конца ясными. Цель работы: изучение иммунофенотипа лимфоцитов мышей при экспериментальной инфекции, вызванной вариантами одного штамма вируса клещевого энцефалита (ВКЭ) 57 и 58. Установлено, что оба варианта вызывали снижение численности НК клеток и Т-регуляторных клеток. Вариант 57 вызывал увеличение численности В-лимфоцитов. Комбинированное заражение животных вариантами 57 и 58 вызывало дисбаланс иммунного ответа, характеризующийся снижением численности пула Т-лимфоцитов, Т-хелперов, НК клеток и повышением уровня В-лимфоцитов. Вирусы при одновременном заражении мышей индуцировали активацию эффекторов иммунной системы. Таким образом, на ранних этапах инфекционного процесса продемонстрирована способность вариантов ВКЭ, являющихся компонентами одной вирусной популяции, модулировать эффекторные функции врожденного и адаптивного иммунитета.

*Ключевые слова:* клещевой энцефалит, иммунофенотип лимфоцитов, НК-клетки, Т-регуляторные клетки.

Вирус клещевого энцефалита (ВКЭ) относится к группе флавивирусов млекопитающих, переносимых клещами. Репликация ВКЭ в центральной нервной системе (ЦНС) приводит к серьезным неврологическим расстройствам. В настоящее время патогенетические механизмы клещевого энцефалита, в том числе взаимодействие вируса с иммунной системой, активно изучаются, но все еще остаются не до конца ясными.

В экспериментах на лабораторных животных ранее было показано, что штаммы ВКЭ могут значительно различаться по своим патогенетическим характеристикам. Вопрос, каким образом вирулентность вируса связана с особенностями формирования иммунного ответа при флавивирусной инфекции, остается мало изученным.

Как и другие вирусы, ВКЭ обладает способностью модифицировать действие иммунной системы и уходить от его распознающего вли-

яния. Например, вирус приводит к формированию внутриклеточных везикул, которые могут защищать репликативную форму вирусной РНК от клеточного распознавания через RIG-I и MDA-5 пути [4], и таким образом отодвигать время начала индукции ИФН 1-го типа. ВКЭ также обладает способностью к репликации в разных типах клеток иммунной системы. Показано, что Т-клетки могут поддерживать репликацию штаммов ВКЭ: Абсеттаров, Найдорфл, Нурт 71. В литературе имеются сведения о взаимодействии ДК и ВКЭ [2]. Однако эти данные носят фрагментарный характер, в настоящее время недостаточно изучены молекулярно-клеточные механизмы взаимодействия вируса с макроорганизмом, в частности, мало известно о влиянии эффекторов как врожденного, так и адаптивного иммунитета на течение КЭ.

Показано, что ВКЭ может существовать в виде стабильной гетерогенной популяции, со-

державшей варианты, обладающие селективным преимуществом при репродукции либо в клетках, либо в млекопитающих. Такие варианты одного и того же штамма могут значительно различаться по своим патогенетическим характеристикам и, соответственно, по способности индуцировать противовирусный иммунный ответ. Характер активации врожденного и адаптивного иммунного ответа может зависеть от соотношения этих вариантов в популяции.

**Цель работы:** изучение иммунофенотипических особенностей лимфоцитов мышей при экспериментальной инфекции, вызванной вариантами одного штамма ВКЭ 57 и 58.

**Материалы и методы. Экспериментальные животные.** Использованы мыши линий Balb/c (SPF, самки, 15-16 г), полученные из питомника лабораторных животных «Пушино», содержащиеся в условиях вивария ФГУП «Предприятие по производству бактерийных и вирусных препаратов Института полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М. П. Чумакова».

**Вирусы, используемые в работе.** ВКЭ: варианты 57 и 58, полученные клонированием бляшек из популяции адаптированного к клеткам варианта штамма ЭК-328. Штамм относится к сибирскому подтипу ВКЭ. Варианты 57 и 58 отличаются друг от друга двумя аминокислотами в поверхностном белке Е. Ранее в экспериментах на мышах вирусы продемонстрировали различия по нейтроинвазивности и чувствительности к интерферону.

Животных заражали интраперитонеально по 0,3 мл 1000000 БОЕ вируса в виде культуральной жидкости инфицированных клеток СПЭВ 17/91. В каждой группе исследовано по 6 мышей.

Оценку субпопуляционной структуры лимфоцитов селезенки мышей осуществляли методом проточной цитометрии с применением моноклональных антител против соответствующих антигенов различных субпопуляций лимфоцитов. Мононуклеарные лейкоциты (МЛ) выделяли из селезенки при гомогенизации в среде RPMI 1640 (ПанЭко, Россия) с последующим лизисом эритроцитов гипотоническим шоком. Клетки отмывали холодным фосфатно-солевым буфером (ФСБ) с 1% фетальной телячьей сывороткой (ФТС) и окрашивали согласно инструкции производителя (e-Bioscience, США) мечеными флюорохромом моноклональными антителами к поверхностным клеточным маркерам (CD3, CD4,

CD8, CD19, МНС II, меченые FITC; CD25, NK1.1-PE; Foxp3-APC, CD45-PerC7). Клетки отмывали 2 раза холодным ФСБ с 1% ФТС. Результаты учитывали на проточном цитометре FC-500 (Beckman Coulter, США). Гейт (окно) популяции клеток устанавливали на основе комбинации прямого и бокового светорассеяния и размера клеток. При учете результатов подсчитывали 10000 клеток в гейте.

Статистическая значимость различий уровня цитокинов между группами оценивали непараметрическими методами исследования с помощью критерия Mann-Whitney. Статистически достоверными считали различия при  $p \leq 0,05$ .

**Результаты и обсуждение.** Исследование субпопуляционной структуры лимфоцитов селезенки мышей, зараженных вариантами ВКЭ, выявило свои особенности. Оба вируса не вызывали повышения численности Т-клеток (CD45/CD3) по сравнению с интактными мышами. Количество Т-хелперов (CD3/CD4) и CTL (цитотоксических лимфоцитов (CD3/CD8) оставалось также на уровне контроля.

Основным фактором, препятствующим активному размножению вирусов и инфицированию пораженного организма, являются зрелые цитотоксические лимфоциты (CD8 Т-клетки, CTL), обладающие важным свойством – специфичностью действия на клетку-мишень, т.е. способностью уничтожать только клетки, пораженные вирусными частицами [5].

В нашем исследовании варианты 57 и 58 оказывали супрессирующее влияние на НК-клетки (с 7,3% в контроле) до 3% (вариант 58) и до 1,8% (вариант 57).

У мышей, зараженных вариантами 57 и 58, снижалось содержание НКТ клеток с 0,4% (в контроле) до 0,1% ( $p < 0,05$ ) и Т-regs с 0,9% (в контроле) до 0,3% (вариант 57) и 0,5% (вариант 58). Вирусы также повышали ( $p < 0,05$ ) уровень клеток с ранним маркером активации (CD45/CD25) в 1,5–1,7 раз (вариант 57-13,4%, вариант 58-15,3%). Отличительной особенностью варианта 57 была индукция повышения численности В-лимфоцитов (CD45/CD19) в 1,4 раза по сравнению с вариантом 58 (соответственно, 19,8% и 14,0%).

Смешанное инфицирование мышей вариантами 57 и 58 привело к неожиданным результатам. У мышей, одновременно зараженных данными вирусами, отмечалась иммуносупрессия со снижением количества Т-клеток (в 1,7 раза –

с 32,5% до 19,5%), преимущественно представленных субпопуляцией Т-хелперов (CD3/CD4) в 1,95 раз (с 25,6% до 13,1%) по сравнению с интактными мышами. При этом наблюдалась тенденция к повышению численности В-лимфоцитов (с 14,2 до 18,0%,  $p < 0,05$ ). Иммунный ответ у этих мышей также характеризовался преобладанием субпопуляций клеток с экспрессией маркера активации CD25 (13,1%). Об активации процессов пролиферации и дифференцировки лимфоцитов свидетельствовало усиление экспрессии маркера рецептора для IL-2 (CD25). Молекула CD25 маркирует активированные Т-лимфоциты вне зависимости от их субпопуляционной принадлежности и активированные В-клетки [4].

Таким образом, варианты одного штамма ВКЭ практически не отличались по своему действию на субпопуляционную структуру лимфоцитов инфицированных мышей по отдельности, но в эксперименте со смешанной инфекцией проявили неожиданные свойства.

Оба варианта в той или иной мере вызывали снижение численности НК клеток и Т-регуляторных клеток. Вариант 57 вызывал увеличение численности В-лимфоцитов. Комбинированное заражение животных вариантами 57 и 58 вызывало дисбаланс иммунного ответа, характеризующийся снижением численности пула Т-лимфоцитов, Т-хелперов, НК-клеток и повышением уровня В-лимфоцитов. Вирусы при одновременном заражении мышей индуцировали активацию эффекторов иммунной системы.

Известно, что, глубокий дефицит Т-клеточного звена иммунитета в острой фазе инфекционного процесса, а также дисфункция гуморального и цитокинового звеньев иммунной системы влекут за собой тяжелое течение КЭ [1]. Нами показано, что заражение вариантами одного штамма ВКЭ в виде моноинфекции и смешанной инфекции разнонаправленно влияет на экспрессию дифференцировочных и активационных молекул на эффекторах врожденного и адаптивного иммунитета. Таким образом, на ранних этапах инфекционного процесса продемонстрирована способность вариантов ВКЭ, являющихся компонентами одной вирусной популяции, модулировать эффекторные функции врожденного и адаптивного иммунитета.

Работа частично поддержана грантом РФФИ № НК 15-04-04500/15

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Крылова Н. В. Клеточные и молекулярные механизмы противовирусной защиты при клещевом энцефалите // Дисс. докт. мед. наук., Москва, 2014.
2. Dörrbecker B, Dobler G, Spiegel M, Hufert FT. // *Travel Med Infect Dis.* – 2010. – V. 8 (4). – P. 213-22.
3. Hayasaka, D. et al. // *Virology.* – 2009. – V. 390. – P. 139-150.
4. Palus M, Bílý T, Elsterová J, Langhansová H, Salát J, Vancová M, Růžek D. // *J Gen Virol.* – 2014. – V. 95 (Pt 11). – P. 2411-26.
5. Xu J, Wu R, Xiang F, Kong Q, Hong J, Kang X. // *Cell Immunol.* – 2015. – V. 30. – 295 (2). – P. 105-111.

#### SUBPOPULATION STRUCTURE OF LYMPHOCYTES AT THE EXPERIMENTAL INFECTION FOR MICE, CAUSED BY THE VARIANTS OF ONE STRAIN OF VIRUS OF TICK-BORNE ENCEPHALITIS

O. V. Motuzova, E. A. Akhmatova, V. G. Khomenkov, N. K. Akhmatova,  
O. V. Lebedinskaya, G. G. Karganova

Currently, the pathogenetic mechanisms of tick-borne encephalitis, including the interaction of the virus with the immune system is actively being studied, but are not still completely clear. Objective: To study the immunophenotype of lymphocytes of mice in experimental infection by variants of tick-borne encephalitis virus strains 57 and 58. Purpose: To study the immunophenotypic features of mice lymphocytes in experimental infection caused by one strain of TBEV and variant received from this strain population, similar in their virulence, but differ in several amino acid substitutions in non-structural proteins NS2A and NS4A: EK-328 and variant 58. Both viruses in one way or another caused decline of NK cells and T-reg cells amount. EK-328, in contrast to the variant 58, activated CD45/CD3 T lymphocytes, CD3/CD4 T helper cells, CD3/CD8 cytotoxic T cells and CD45/CD19 B lymphocytes. In the early stages of infection demonstrated the ability of TBEV strains modulate effector functions of innate and adaptive immunity.

*Keywords:* tick-borne encephalitis, immunophenotype of lymphocytes, NK, T-reg cells.

## СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАЗЛИЧНЫХ СПОСОБОВ СОЗРЕВАНИЯ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК *IN VITRO*

Лежнин Ю. Н.<sup>1,2</sup>, Чумаков С. П.<sup>2</sup>, Чумаков П. М.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБУ Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта Российской академии наук (ИМБ РАН); <sup>2</sup>ФГБУ Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН)  
Москва, Россия

Основной проблемой создания клеточных вакцин на основе дендритных клеток, а также терапии на основе CD8<sup>+</sup> цитотоксических лимфоцитов является поиск эффективного созревания дендритных клеток *in vitro*. В данной работе были проанализированы два пути индуцированного созревания дендритных клеток, созревание индуцированное смесью цитокинов (IL-1-b, TNF-alpha, INF-gamma) и созревание индуцированное бактериальным липополисахаридом (LPS). Было показано, что добавление бактериального липополисахарида в питательную среду приводит к более эффективному созреванию, что в значительной степени влияет на презентацию антигена и активацию цитотоксических Т-лимфоцитов.

**Ключевые слова:** Дендритные клетки (ДК), цитотоксические-Т-лимфоциты (ЦТЛ), липополисахарид (ЛПС), цитокины.

На сегодняшний день все большую популярность при лечении раковых заболеваний приобретают подходы, основанные на использовании иммунного потенциала самого пациента. Такие способы лечения объединяют в одну большую группу под названием «иммунотерапия рака». Быстрый рост популярности этих методов объясняется высокой степенью безопасности для пациента по сравнению с традиционными способами лечения, такими как радиотерапия и химиотерапия. Иммунотерапевтические средства вызывают усиление иммунного ответа или могут блокировать «маскирующие» рецепторы на поверхности раковых клеток, что не приводит к каким-либо токсическим эффектам, влияющим на все клетки организма, а позволяет иммунной системе самой выявить и избирательно уничтожить только раковые клетки. Двумя наиболее перспективными иммунотерапевтическими подходами считаются клеточные вакцины, основанные на применении дендритных клеток, а также направленная активация цитотоксических-Т-лимфоцитов (ЦТЛ) к определенному раковому рецептору [1-3]. Обе методики предполагают использование дендритных клеток как ключевого медиатора презентации антигена эффекторным клеткам иммунной системы. Основным моментом, обуславливающим качественный результат,

является правильный выбор методик, направленных на созревание дендритных клеток. Таким образом, главной целью данной работы является определение оптимальных условий созревания дендритных клеток.

**Материалы и методы. Получение фракции моноцитов крови человека (РВМС).** Фракция моноцитов периферической крови была получена из 50 мл крови здорового донора путем центрифугирования в градиенте плотности фикола. Клетки культивировали в среде RPMI-1640 с добавлением 10% ФБС (фетальной бычьей сыворотки) в количестве  $5 \times 10^7$  клеток. **Культивирование и созревание (матурация) дендритных клеток.** Фракцию моноцитов в количестве  $5 \times 10^7$  культивировали в питательной среде RPMI-1640 (10% ФБС). Клетки инкубировали при 37 °С, в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> в течение 2 часов. В дальнейшем, суспензионные клетки удаляли и переносили на другую 75 см<sup>2</sup> культуральную чашку. К адгерентным клеткам добавляли питательную среду RPMI-1640 (10% ФБС), 1 нг/мл GM-CSF и 2 нг/мл IL-4 (PeproTech, США) [3]. На третий день к клеткам добавляли свежую среду RPMI-1640, содержащую GM-CSF и IL-4 в той же концентрации. На пятый день незрелые дендритные клетки снимали и переносили в 24-луночный планшет в концентрации  $5 \times 10^5$  кл/мл (1 мл/луночка). Также к клеткам до-

бавляли лизат клеток линии RKO (карцинома толстой кишки), выступающий в качестве источника антигена. Лизат клеток получали методом последовательного замораживания-оттаивания. Количество клеток RKO брали исходя из соотношения 1 (ДК):10 (RKO). Культивацию с антигеном проводили 24 часа в питательной среде RPMI-1640 (10% ФБС, 1 нг/мл GM-CSF, 2 нг/мл IL-4).

В дальнейшем, дендритные клетки были разделены на три группы: **группа а:** созревание дендритных клеток осуществляли добавлением бактериального липополисахарида (ЛПС); **группа б:** созревание проводили с помощью смеси цитокинов: IL-1-b, TNF-alpha, INF-gamma; **группа с:** контрольные незрелые дендритные клетки. *Культивирование и активация цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ).* Суспензионные клетки, полученные на этапе выделения незрелых дендритных клеток, были использованы в качестве источника цитотоксических Т-лимфоцитов. Цитотоксические Т-лимфоциты выделяли методом иммуномагнитной сепарации, с помощью «EasySep™ Human CD8+ T Cell Enrichment Kit» (StemCell, США). Полученную таким образом популяцию лимфоцитов культивировали в среде RPMI-1640 (10% ФБС). Пролиферацию лимфоцитов активировали добавлением в питательную среду фитогемагглютинаина (ФГА) в конечной концентрации 10 мкг/мл, клетки инкубировали при 37 °С в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>. После четырех дней культивации лимфоциты собирали, центрифугировали при 400 g 10 минут и ресуспендировали в 2 мл питательной среды RPMI-1640 (10% ФБС). Количество клеток подсчитывали с помощью камеры Фукса-Розенталя.

Впоследствии культуру первичных ЦТЛ и зрелых ДК переносили на 12 луночный планшет в количестве 5x10<sup>5</sup> ДК/луночка и 5x10<sup>6</sup>/луночка, что соответствует соотношению клеток 1 (ДК):10 (ЦТЛ). Совместную культивацию проводили в 1.5 мл среды RPMI-1640 с добавлением 10% ФБС и смеси цитокинов: IL-2 (5 нг/мл), IL-7 (5 нг/мл) в течение 48 часов.

Эффективность созревания дендритных клеток и презентации антигена проверялась сравнением способности лимфоцитов элиминировать трансгенные клетки линии RKO, экспрессирующие флуоресцентный белок tagRFP. Для этого проводили сокультивацию RKO-tagRFP и активированных цитотоксических Т-лимфоцитов в нескольких соотношениях:

1:10, 1:50, 1:100 (RKOtagRFP: ЦТЛ). Эффективность элиминации раковых клеток линии RKO проверяли измерением уровня пролиферации клеток с помощью набора CyQUANT Cell proliferation Assay и измерением уровня флуоресценции на Microplate Reader triad LT (Dy nex Technologies, США). *Плазмиды и подготовка лентивирусных частиц.* Для получения стабильной клеточной линии RKO, экспрессирующей последовательность гена tag-RFP, использовалась система доставки на основе лентивирусных частиц. Упаковка лентивирусных частиц осуществлялась с помощью рекомбинантного лентивирусного вектора pLCMV-tagRFP, и вспомогательных плазмид pCMV-GAG и pCMV-ΔR8.2. Упаковку рекомбинантных лентивирусных частиц осуществляли в клетках линии HEK293T. Трансфекцию клеток линии HEK293T проводили с помощью катионного реагента TurboFect (Life Technologies, США). Сбор вирусных стоков проводили через 48 и 72 часа после трансфекции. Вирусные частицы концентрировали ультрацентрифугированием при 40000 rpm, 40 минут на ультрацентрифуге Beckman TL100 (США). Заражение клеток линии RKO проводили в бессывороточной питательной среде DMEM с добавлением полибрена в конечной концентрации 8 мкг/мл. Через 24 часа клетки переносили в свежую питательную среду DMEM (10% ФБС). Эффективность экспрессии флуоресцентного белка проверяли через 72 часа после вирусного заражения. Клетки, обладающие необходимым уровнем экспрессии флуоресцентного маркера отделяли путем сортировки на клеточном сортере BD FACS Vantage SE (BD, США).

**Результаты и обсуждение.** В первый день культивации дендритные клетки представляли собой однородную, адгерентную популяцию. Через 3 дня культивации клеток на питательной среде с цитокинами количество суспензионных клеток значительно выросло. На 6 день культивации вся популяция представляла собой сугубо суспензионную культуру, с небольшим количеством цитоплазматических выростов. После добавления антигена и культивации с матрирующими факторами, дендритные клетки представляли собой по-прежнему суспензионную культуру, при этом значительно изменилась сама форма клеток, характеризующаяся наличием большого количества цитоплазматических отростков, что косвенно подтверждало процесс созревания. Измерение эффек-



тивности созревания ДК определялось при помощи уровня элиминации раковых клеток цитотоксическими Т-лимфоцитами. Результаты измерения флуоресценции условных групп: **a** – 10715 (12,77%), **b** – 20522 (24,47%), **c** – 38137 (45,46%), **d** – 83883 (100%). Группа **d** представляла собой популяцию клеток линии RKO без культивации с лимфоцитами, относительно которой рассчитывался процент флуоресценции. Низкий уровень флуоресценции указывает на высокий уровень элиминации раковых клеток. Таким образом, опираясь на полученные данные можно утверждать, что использование бактериального липополисахарида является наиболее оптимальной методикой созревания

ДК, и может использоваться в дальнейших исследованиях применения ДК и ЦТЛ в области иммунотерапии.

Работа выполнена при поддержке Федеральной целевой программы в рамках Соглашения №14.607.21.0062 (уникальный идентификатор прикладных научных исследований RFMEFI60714X0062).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. June C. H. J Clin Invest, 2007. 117 (5): p. 1204-12.
2. Palucka K. and J. Banchereau. Immunity, 2013. 39 (1): p. 38-48.
3. Mody N., et al. Expert Rev Clin Immunol, 2015. 11 (2): p. 213-32.

### COMPARATIVE CHARACTERISTICS OF THE VARIOUS WAYS FOR DENDRITIC CELLS MATURATION *IN VITRO*

Lezhnin Y. N.<sup>1,2</sup>, Chumakov S. P.<sup>1</sup>, Chumakov P. M.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Engelhardt Institute of Molecular Biology Russian Academy of Sciences; <sup>2</sup>Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

The main goal of development cell vaccines based on dendritic cells and also therapies based on CD8<sup>+</sup> cytotoxic lymphocytes is searching for an effective method for dendritic cells maturation *in vitro*. In this work two ways induced maturation of dendritic cells were analyzed: maturation induced by mixture of cytokines (IL1-b, TNF-alpha, INF-gamma) and maturation induced by bacterial lipopolysaccharide (LPS). It has been shown that the presence of bacterial lipopolysaccharide in the culture medium lead to more effective maturation. It is greatly affect to antigen presentation and activation of cytotoxic T-lymphocytes.

### К ВОПРОСУ О РЕЗИСТЕНТНОСТИ К ИНТЕРФЕРОНОТЕРАПИИ ПРИ ГЕРПЕСИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ

Малашенкова И. К.<sup>1</sup>, Крынский С. А.<sup>1</sup>, Огурцов Д. П.<sup>2</sup>,  
Хайлов Н. А.<sup>1</sup>, Казанова Г. В.<sup>1</sup>, Гурская О. Г.<sup>2</sup>, Жарова М. А.<sup>2</sup>,  
Зуйков И. А.<sup>2</sup>, Дидковский Н. А.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>НИЦ «Курчатовский институт»; <sup>2</sup>ФГБУН НИИ физико-химической медицины ФМБА России, Москва, Россия

Лечение больных герпесвирусными инфекциями основано на применении препаратов аномальных нуклеотидов. При развитии устойчивости к аномальным нуклеотидам препаратом выбора является интерферон-α (ИФН-α). В свою очередь, при терапии препаратами ИФН-α также может развиваться резистентность, однако ее механизмы изучены недостаточно. Исследовали механизмы развития резистентности к интерферонотерапии у 40 больных с активной инфекцией, вызванной вирусом Эпштейна-Барр (ВЭБ) и/или вирусом герпеса человека 6 типа (ВГЧ-6) с устойчивостью к аномальным нуклеотидам. Показана роль повышения уровня IgG-аутоантител к ИФН-α, степени вирусной нагрузки (ВГЧ-6 и ВЭБ), а также полиморфизмов гена ИЛ-28В.

**Ключевые слова:** герпесвирусы, интерферон-α, резистентность.

Герпесвирусная инфекция (ГВИ) занимает ведущее место по распространенности и широте вызываемых патологических процессов. ГВИ ассоциирована со многими болезнями «цивилизации»: атеросклерозом, ишемической болезнью сердца, аутоиммунными заболеваниями, онкопатологией. При развитии устойчивости к аномальным нуклеотидам препаратом выбора в терапии ГВИ является интерферон- $\alpha$  (ИФН- $\alpha$ ). В свою очередь, при терапии препаратами ИФН- $\alpha$  также может развиваться резистентность, однако ее механизмы остаются неизученными.

**Целью исследования** было изучение механизмов развития резистентности к интерферонотерапии у больных герпесвирусной инфекцией (ВЭБ и ВГЧ-6) с устойчивостью к аномальным нуклеотидам.

**Материал и методы исследования.** В исследование вошли 40 больных ГВИ, вызванной вирусами Эпштейна-Барр (ВЭБ) и герпеса человека 6 типа (ВГЧ-6) в возрасте от 23 до 55 лет, 24 жен. и 18 муж., с наличием резистентности к аномальным нуклеотидам (по клиническим и лабораторным данным). Длительность заболевания – от 3-х до 7 лет. Диагноз ГВИ ставился на основании жалоб, анамнеза, общеклинического обследования, серологических маркеров и количественного определения вирусной нагрузки в крови и орофарингеальной области. Наиболее частыми жалобами пациентов были субфебрилитет, общая слабость, головные, мышечные и суставные боли, дискомфорт в горле, расстройства сна. Уровень интерферонов и аутоантител к ИФН- $\alpha$  больных сравнивали с показателями группы здоровых лиц (28 чел.). После получения информированного согласия терапию проводили рекомбинантным ИФН- $\alpha$  – реафероном (РФН) в дозе 3 млн. ЕД в течение 1 месяца. До и после интерферонотерапии исследовали вирусную нагрузку ВЭБ и ВГЧ-6 методом RT-PCR («Ампли-Сенс»), определяли содержание ИФН- $\alpha$  и АТ к ИФН- $\alpha$  в сыворотке крови методом ИФА, («Цитокин»), исследовали полиморфизмы гена ИЛ-28В rs12979860 и rs8099917 методом RT-PCR («ДНК-Технология»).

**Результаты.** При ПЦР исследовании в слюне обнаружена ДНК ВГЧ-6 у 28 больных, в крови у 2-х, ДНК ВЭБ – у 26 больных, в крови – у 8 в клинически значимой концентрации. Одновременно ДНК ВЭБ и ВГЧ-6 выявили у 19 из 40 человек. После окончания терапии РФН

ДНК ВГЧ 6 типа выявлялась у 25 из 28 больных (уменьшение на 10,71%), ДНК ВЭБ – у 14 из 26 (уменьшение на 46,15%), в крови – у 4 из 8 больных. Также снизилось число пациентов с микст ГВИ, вызванной ДНК ВГЧ 6 типа и ВЭБ, с 19 до 12 чел (36,84%).

У 25 больных до проведения интерферонотерапии уровень ИФН- $\alpha$  составил в среднем  $3,4 \pm 0,22$  пг/мл, что было ниже показателя здоровых ( $5,8 \pm 0,43$ ). У 20 из них было выявлено высокое содержание АТ к ИФН- $\alpha$  ( $19,84 \pm 2,5$  усл.ед. при норме  $7,32 \pm 0,8$  усл.ед. ( $p < 0,01$ )). После терапии уровень АТ к ИФН- $\alpha$  в данной подгруппе повысился в среднем до  $28,29 \pm 3,3$  усл.ед. У 15 пациентов с исходно повышенным уровнем ИФН- $\alpha$  (в среднем  $24,26 \pm 4,62$  пг/мл, при показателе среди доноров  $5,8 \pm 0,43$  пг/мл,  $p < 0,01$ ), содержание АТ к ИФН- $\alpha$  также в среднем превышало нормальные показатели –  $17,47 \pm 3,1$  усл.ед. После терапии РФН у этих пациентов отмечалась тенденция к дальнейшему повышению уровня АТ к ИФН- $\alpha$  (с  $17,47 \pm 3,1$  усл.ед. до  $21,62 \pm 3,8$  усл.ед.).

Более, чем у половины больных с высокой вирусной нагрузкой ( $>10^4$  копий /мл ВЭБ) выявлено снижение уровня ИФН- $\alpha$ . При исследовании полиморфизма 39738787C>T (rs12979860) гена ИЛ-28В нормальный генотип СС был выявлен у 40% пациентов, гетерозиготный генотип СТ – у 50,0%, мутантный ТТ – у 10% пациентов. По данным GenBank [4] частота мутантного аллеля Т в общей популяции Европейского региона составила 27,7%, тогда как в нашем исследовании – 60%. При исследовании полиморфизма 39743165T>G (rs8099917) гена ИЛ-28В нормальный генотип ТТ был выявлен у 75% пациентов, гетерозиготный ТG – у 22,5%, мутантный GG – у 3,5%. В Европейском регионе по данным GenBank [4] частота носительства мутантного аллеля G составляет 15%, тогда как в нашем исследовании – 26%.

Следует отметить, что у 2 из 40 обследованных пациентов с ГВИ имела место гомозиготная мутация в обоих исследованных участках гена ИЛ-28В. Среди пациентов с наличием полиморфизмов в гене ИЛ-28В в 2 раза реже наблюдались случаи подавления репликации ВЭБ после интерферонотерапии, однако на данном количестве наблюдений эта разница недостоверна.

**Выводы.** 1. Монотерапия рекомбинантным интерфероном- $\alpha$  в течение 1 мес. больных с герпесвирусной инфекцией, резистентной

к аномальным нуклеотидам, привела к снижению частоты выявления ДНК ВЭБ (на 46,15%), в то время как выявление ВГЧ-6 снизилось незначительно (на 10,71%).

2. У пациентов с герпесвирусной инфекцией, резистентной к аномальным нуклеотидам, обнаружено достоверное по сравнению с нормой повышение уровня IgG-аутоантител к ИФН- $\alpha$ ; после применения в течение 1 мес. рекомбинантного интерферона- $\alpha$  наблюдалось дальнейшее увеличение уровня IgG-аутоантител к ИФН- $\alpha$ .

3. Высокая вирусная нагрузка ВГЧ-6 и ВЭБ у пациентов с герпесвирусной инфекцией, резистентной к аномальным нуклеотидам, ассоциирована с низким уровнем сывороточного ИФН- $\alpha$ .

4. У пациентов с герпесвирусной инфекцией, резистентной к терапии аномальными

нуклеотидами, выявлена тенденция к увеличению частоты единичных нуклеотидных замен 39743165T>G (rs8099917) и 39738787C>T (rs12979860) гена ИЛ-28В.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Интерферон-2011 // Сборник научных статей. Под редакцией академика РАМН, профессора Ф. И. Ершова и профессора А. Н. Наровлянского – Москва.– 2012.– 512 с.
2. Dagna L., Pritchett J.C., Lusso P. //Future Virol. 2013 Mar;8 (3):273-287.
3. Shahin D., El-Refaey A.M., Amany K. et al. // Egyptian Journal of Medical Human Genetics Volume 12, Issue 2, November 2011, Pages 139-146.
4. Emmanuel Thomas // Gastroenterol Hepatol (N Y). Jun 2011; 7 (6): 407-409.
5. Yokota S., Yokosawa N., Okabayashi T. et al. // J Virol. 2004 Jun; 78 (12):6282-6.

### INTERFERON RESISTANCE IN PATIENTS WITH HERPESVIRUS INFECTIONS

**Malashenkova I. K.<sup>1</sup>, Krynskiy S. A.<sup>1</sup>, Ogurtsov D. P.<sup>2</sup>, Hailov N. A.<sup>1</sup>, Kazanova G. V.<sup>1</sup>, Gurskaya O. G.<sup>2</sup>, Dzarova M. A.<sup>2</sup>, Zuikov I. A.<sup>2</sup>, Didkovsky N. A.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>FSBIS NRC of physical-chemical medicine FMBA of Russia;

<sup>2</sup>NRC "Kurchatov Institute", Moscow, Russia

Treatment of herpesvirus infections is based on nucleotide analogue drugs. If resistance to nucleotide analogues develops, interferon- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) is recommended. Therapy with IFN- $\alpha$  drugs can also result in development of resistance, but its mechanisms are still poorly studied. We researched mechanisms of interferon resistance in 40 patients with active infections caused by Epstein-Barr virus (EBV) and/or human herpesvirus type 6 (HHV-6) that were resistant to nucleotide analogues. Our results show the role of IgG autoantibodies to IFN- $\alpha$ , the extent of EBV and HHV-6 viral load and IL-28B genetic polymorphisms in interferon resistance.

*Keywords:* herpesviruses, interferon- $\alpha$ , resistance.

## НЕКОТОРЫЕ АСПЕКТЫ ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ ТЕОРИИ РАЗВИТИЯ ГЛАУКОМНОЙ ОПТИЧЕСКОЙ НЕЙРОПАТИИ

Маркелова Е. В., Хохлова А. С., Кириенко А. В.,  
Догадова Л. П.

ГОУ ВПО «Тихоокеанский Государственный Медицинский Университет»  
Минздрава России, Владивосток, Россия

На сегодняшний день, в литературе представлены неоднозначные данные о роли трансформирующего фактора роста (TGF- $\beta$ ) в развитии глаукомной оптической нейропатии (ГОН). Клинически и лабораторно обследовано 133 пациента с первичной открытоугольной глаукомой (ПОУГ) I–III стадий. В сыворотке крови и слезной жидкости определяли содержание цитокинов TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2. В сыворотке крови и слезной жидкости выявлена разнонаправленная динамика TGF- $\beta$ 1 и TGF- $\beta$ 2. Зафиксирован высокий уровень TGF- $\beta$ 2 у пациентов с ПОУГ, с постепенным его повышением, достигающим при III стадии ПОУГ 288,63 (201,21; 320,60) пг/мл при контроле 168,50 (110,0; 206,4) пг/мл. Выявлена важная роль TGF- $\beta$ 1 и, особенно, TGF- $\beta$ 2, вызывающего, по-видимому, фиброз и ремоделирование тканей глаза, в механизмах нарушения иммунного ответа у больных ПОУГ.

*Ключевые слова:* цитокины, первичная открытоугольная глаукома, глаукомная оптическая нейропатия.

**Актуальность и цель работы.** На сегодняшний день, в литературе представлены неоднозначные данные о роли трансформирующего фактора роста (TGF- $\beta$ ) и его подсемейств (1, 2 и 3 типы) в развитии глаукомной оптической нейропатии (ГОН). Семейство TGF- $\beta$  обладает двойственными биологическими свойствами классического иммуносупрессора пролиферации разных клеток и важнейшего иммуномодулятора в контроле защитных реакций организма (нейротрофический фактор защиты) [1]. Вместе с тем, чаще высказываются мнения о повышении и негативном значении этого фактора [2]. Тесная связь продукции TGF- $\beta$  с функционированием субпопуляции иммунорегуляторных клеток (Treg) и матриксных металлопротеиназ (ММП) обуславливает значение этой группы цитокинов в развитии вторичной иммунопатологии [3]. Есть доказательства того, что сбой молекулярного механизма, контролирующего сигнальный механизм TGF- $\beta$ , вносит вклад в развитие ГОН и ведет к развитию глазной гипертензии [4]. Уровни TGF- $\beta$ 1 и TGF- $\beta$ 2 обнаружены незначительно повышенными, причем с широким диапазоном [5]. Таким образом, исследование

TGF- $\beta$  при глаукоме занимает ведущее место в работах последних лет, предполагая значительную роль цитокина в патогенезе болезни.

**Целью** нашей работы явилось уточнение иммунных факторов патогенеза ГОН. Задачи исследования: анализ системного и локального уровня цитокинов семейства TGF: TGF- $\beta$ 1 и TGF- $\beta$ 2, исследование корреляции между уровнем цитокинов (в сыворотке и слезе) и стадиями первичной открытоугольной глаукомы (ПОУГ).

**Материалы и методы.** Клинически и лабораторно обследовано 133 пациента с ПОУГ I–III стадий, из них в возрасте до 59 лет – 32 (24%) человек, старше 60 лет – 101 (76%) человек. Количество пациентов с I стадией составило 39 (29,3%) человек, со II стадией 56 (42,1%) человек и с III стадией – 38 (28,6%) человек. Контрольную группу составили 50 практически здоровых добровольцев, возраст которых был  $53,45 \pm 2,35$  года, из них 30 (60%) женщин и 20 (40%) мужчин. В сыворотке крови и слезной жидкости определяли содержание цитокинов TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2. Забор слезной жидкости проводился после раздражения парами аммиака, инсулиновым шприцем (игла предварительно

снята) из внутреннего угла глаза. Обработка всех цифровых данных проводилась методами описательной непараметрической статистики с использованием программ Statistica 6.0 и SPSS V 16. Рассчитывались медиана (Me), минимальное и максимальное значения, нижний и верхний квартили ( $Q_{25}$ ,  $Q_{75}$ ). Концентрации в тексте приведены в виде Me ( $Q_{25}$ ,  $Q_{75}$ ). Уровень доверительной вероятности был задан равным 95%.

**Результаты.** В сыворотке крови обнаружено, в зависимости от стадий, постепенное понижение уровня TGF- $\beta$ 1. При I стадии ПОУГ концентрация составила 14,77 (10,75; 18,31) нг/мл, уровень достоверности по сравнению с контролем  $p < 0,05$ . При II и III стадиях концентрация соответственно составила 15,35 (12,23; 19,71) нг/мл и 13,25 (10,6; 17,30) нг/мл,  $p < 0,05$  в сравнении с контролем. Таким образом, выявлено достоверное снижение уровня данного цитокина у пациентов с I и III стадиями ПОУГ по сравнению с контрольной группой ( $p < 0,05$ ), тогда как значения этого цитокина в сыворотке крови при II стадии ПОУГ были на уровне контрольных величин.

Уровень TGF- $\beta$ 2 был достоверно выше у пациентов с ПОУГ II и III стадиями по сравнению с I и группой контроля ( $p < 0,05$ ). Концентрация в I, II, III стадиях соответственно составила 190,42 (140,6; 240,2) пг/мл; 266,30 (188,4; 288,5) пг/мл и 306,46 (201,28; 340,2) пг/мл. Еще более интересные данные получены при анализе слезной жидкости. Выявлена разнонаправленная динамика TGF- $\beta$ 1 и TGF- $\beta$ 2. При оценке показателей TGF- $\beta$ 1 установлено его достоверное понижение во всех исследуемых группах, причем самое низкое значение выявлено у пациентов с III стадией ПОУГ (200,0 (150,0; 240,0) пг/мл),  $p < 0,01$  при контроле 360,0 (270,0; 425,0) пг/мл. Зафиксирован высокий уровень TGF- $\beta$ 2 у пациентов с ПОУГ, с постепенным его повышением, достигая при III стадии ПОУГ 288,63 (201,21; 320,60) пг/мл при контроле 168,50 (110,0; 206,4) пг/мл.

Таким образом, при анализе цитокинового профиля в зависимости от стадий, подтверждено участие семейства цитокинов TGF- $\beta$  в постепенном развитии ГОН. При I и III стадиях было определено снижение уровня TGF- $\beta$ 1 по сравнению с контрольной группой. TGF- $\beta$ 2, несомненно, влияет на развитие заболевания, вызывая, по-видимому,

с повышением концентрации, ремоделирование тканей трабекулы и решетчатой пластинки зрительного нерва. Полученные результаты позволяют разработать дополнительный дифференциально-диагностический признак ПОУГ II–III стадий: увеличение TGF- $\beta$ 2 в сыворотке крови выше 205 пг/мл сопряжено с ПОУГ II стадии ( $\chi^2 = 4,26$ ,  $p < 0,05$  при 2 ст. свободы) и ПОУГ III стадии ( $\chi^2 = 5,86$ ,  $p < 0,01$  при 2 ст. свободы).

Что касается, локальных процессов, влияние на патогенез этих цитокинов более выражено. Концентрация TGF- $\beta$ 1 достоверно постепенно снижается, а концентрация TGF- $\beta$ 2 повышается с увеличением стадии ПОУГ. Данные подтверждают патогенетическую роль TGF- $\beta$ 2 при ПОУГ, вероятно, стимулированный им фиброз вносит вклад в нарушение оттока внутриглазной жидкости и повышение ВГД.

Таким образом, выявлена важная роль TGF- $\beta$ 1 и, особенно, TGF- $\beta$ 2 в механизмах нарушения иммунного ответа у больных ПОУГ. Данные свидетельствуют о нарушении защитных ингибирующих влияний TGF- $\beta$ 1, направленных на контролирование провоспалительных гиперэргических реакций у пациентов ПОУГ и ослабевании супрессорных влияний цитокина, возможно, обусловленных нарушением дифференцировки Treg и формированием хронического воспаления. Также, результаты отражают влияния TGF- $\beta$ 2, вызывающего, по-видимому, фиброз и ремоделирование тканей глаза. Данные требуют дальнейшего изучения с поиском ранних маркеров прогрессирования и наблюдения за офтальмостатусом и уровнем гуморального иммунитета в динамике у пациентов ПОУГ.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Егоров Е. А. Национальное руководство по глаукоме (путеводитель): руководство для поликлинических врачей. Дом печати, Москва 2014, 135 с.
2. Курышева Н. И. Глаукомная оптическая нейропатия. МЕДпресс-информ, Москва 2006, 136 с.
3. Huang P., Qi Y., Xu Y. S. et al. J Glaucoma 2013, 19 (5), 324-330.
4. Grus F. H., Joachim S. C., Wuenschig D. et al. J Glaucoma 2011, 17 (1), 79-84.
5. Лихванцева В. Г., Габибов А. Г., Соломатина М. В. Национальный журнал глаукома 2014, 13 (2), 17-28.

## SOME ASPECTS OF IMMUNOLOGICAL THEORY OF GLAUCOMATOUS OPTIC NEUROPATHY

Markelova E. V., Khokhlova A. S., Kiriyeenko A. V., Dogadova L. P.

*Pacific State Medical University, Vladivostok, Russia*

The literature data presented ambiguous role of transforming growth factor (TGF- $\beta$ ) in the development of glaucomatous optic neuropathy (GON). There were examined 133 patients with primary open-angle glaucoma (POAG) in I–III stages. It was found a gradual level decrease of TGF- $\beta$ 1 and rise of TGF- $\beta$ 2. There were recorded high levels of TGF- $\beta$ 2 in patients with POAG, with its gradual increase, reaching at stage III POAG 288.63 (201.21; 320.60) pg / ml in the control 168.50 (110.0, 206.4) pg / ml. The analysis of the cytokine profile, depending on the stage of disease revealed that TGF- $\beta$  family of cytokines participates in the gradual development of GON. The importance of the TGF- $\beta$ 1 and, especially, TGF- $\beta$ 2 was demonstrated that apparently evoked fibrosis and eye tissue remodeling, in disturbing the mechanism of the immune response in patients with POAG.

---

---

## РОЛЬ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА В ПОДДЕРЖАНИИ СОСТОЯНИЯ АДАПТАЦИИ У КУРСАНТОВ ПЕРВОГО ГОДА ОБУЧЕНИЯ В ВУЗЕ

Маркина Л. Д., Рыбина Е. В.

*ГБУВПО «Тихоокеанский государственный медицинский университет»,  
Владивосток, Россия*

Уровень здоровья курсантов 1 курса разных факультетов Морского государственного университета оценивали и выражали в баллах по программе «Антистресс» на основе лейкоцитарной формулы, интегрального показателя (соотношение количество сегментоядерных нейтрофилов к лимфоцитам). Определяли гормональный статус. Полученные результаты показали, что на 1 курсе всех факультетов была выявлена одинаковая закономерность в распространенности курсантов с разным уровнем здоровья. Отличительной чертой лиц механического факультета является значительно меньшая балльная оценка в рамках I УЗ и IV УЗ.

*Ключевые слова:* адаптационные реакции, уровень здоровья, гормональный статус.

**Актуальность и цель работы.** В начальном периоде обучения в вузе учебный процесс для курсантов приобретает характер травмирующего фактора. При этом развиваются различные состояния, которые характеризуются снижением функциональных особенностей организма и развитием заболевания. Активные неспецифические механизмы иммунитета поддерживают антигенно-структурный гомеостаз организма. Функционирование этого комплекса передается по наследству, но потенциальный его максимум – показатель индивидуальный. Для каждого курсанта свой потенциальный максимум, что определяет степень неспецифической резистентности организма,

влияя на адаптацию к учебному процессу. Многочисленные исследования свидетельствуют об ухудшении функционального состояния организма курсантов, поступивших в высшие учебные заведения военного и полувоенного типа [4, 5]. В настоящее время важная роль в оценке уровня здоровья (УЗ) практически здоровых курсантов принадлежит анализу их адаптационного состояния. Отечественными учеными Гаркави Л. Х., Квакиной Е. Б. впервые был представлен материал о системном ответе организма на воздействия разных по силе раздражителей [3]. В своих работах, они показали фазовый характер изменения состава крови и выделили помимо известной реакции

стресса (РС) другие типы адаптационных реакций (АР). Многолетние исследования изменений во всех системах организма при различных АР завершились разработкой интегрального показателя (соотношения количество сегментоядерных нейтрофилов к количеству лимфоцитов) оценки адаптационного статуса организма, основанного на анализе лейкоцитарной формулы и созданием компьютерной программы «Антистресс» [3]. Этот метод нашел широкое применение при количественной оценке уровня здоровья на донозологических этапах его исследования [1, 2, 4.]. Выбор темы обусловлен недостаточной разработкой проблемы профессиональной адаптации молодых специалистов к учебному процессу. В связи с этим цель настоящего исследования состояла в изучении динамики адаптационного состояния курсантов – судоводителей и механиков по объективным критериям оценки интегрального показателя белой крови.

**Материалы и методы.** Во время учебного процесса было обследовано 107 курсантов I курса судоводительского и 97 – механического факультетов в возрасте 18-19 лет (с 01.12.2011 г. по 07.12.2011 г.) Обследование проводилось в специальной лаборатории в одно время: с 8 до 9 часов. Уровень здоровья (УЗ) курсантов оценивался на основе клинических анализов крови, интегрального показателя (соотношения количество сегментно-ядерных нейтрофилов к количеству лимфоцитов) с применением компьютерной программы «Антистресс» [3] и выражался в баллах. К I УЗ относили лица с отличным и хорошим состоянием (1680-4960 баллов), ко II УЗ – с удовлетворительным (920-1679); к III – с легким и умеренным нарушением здоровья (320-919); к IV УЗ – в плохом состоянии (10-319 баллов). На иммунологическом анализаторе «Stat fax» реактивами фирмы «Biacon» и «Гр-ИФА» определяли уровень кортизола, тестостерона, соматотропного (СТГ), тиреотропного (ТТГ) гормонов, тироксина (Т4) и трийодтиронина (Т3). Статистическая обработка результатов проводилась с использованием методов описательной статистики, U-критерия Манна-Уитни, реализованных в Microsoft Excel 2010 и пакете статистических программ обработки данных Statistica for Windows, ver.8.0.

**Результаты и обсуждение.** Полученные результаты показали, что у курсантов судоводительского факультета самой многочисленной (52,3%) была группа с I УЗ (3357,14 ±

1175,56 балла). Далее следовали лица со II УЗ (20,6%; 1215,45 ± 308,42 балла), с III УЗ (15,9%; 494,38 ± 170,07 балла). Самой малочисленной (11,2%) была группа с IV УЗ (245,00 ± 40,93 балла). Отличительной чертой лиц механического факультета является значительно меньшая балльная оценка в рамках I УЗ и IV УЗ. Курсанты с I УЗ составили 49,5% (2985,53 ± 1138,92 балла); со II УЗ 23,7% (1248,70 ± 293,45 балла), с III УЗ 22,7% (506,67 ± 170,86 балла); с IV УЗ 4,1% (200,00 ± 52,92 балла). Курсанты судоводительского и механического факультетов с I УЗ обладали гармоничными адаптационными реакциями: РПА, РСА и РТ высокого УР. РПА. И РП среднего УР. Уровень кортизола у курсантов с I УЗ колебался в пределах 260,29 ± 84,93; СТГ – 1,88 ± 1,24; тестостерона – 29,50 ± 2,71; ТТГ – 4,33 ± 0,67; Т3 – 1,46 ± 0,16 и Т4 – 107,98 ± 7,51. Лица со II УЗ обладали РСА среднего уровня реактивности (УР) и РПА низкого УР. Уровень кортизола в данной группе колебался в пределах 491,72 ± 51,42; СТГ – 1,98 ± 0,49; тестостерона – 21,63 ± 4,13; ТТГ – 2,13 ± 0,83; Т3 – 1,91 ± 2,44 и Т4 – 115,18 ± 5,96. Курсанты с III УЗ имели РТ среднего и низкого УР, РСА низкого УР и РП среднего и низкого УР. Уровень кортизола – находился в пределах 755,97 ± 270,20; СТГ – 8,25 ± 2,91; тестостерона – 15,36 ± 4,11, ТТГ – 1,6 ± 0,45; Т3 – 1,34 ± 0,18; Т4 – 100,45 ± 6,94. У курсантов с IV УЗ наблюдалась РС низкого УР, РП среднего и низкого УР. Уровень кортизола у них колебался в пределах 1312,90 ± 85,27; СТГ – 14,49 ± 2,2; тестостерона 9,07 ± 0,24; ТТГ – 1,19 ± 0,05; Т3 – 1,19 ± 0,05; Т4 – 96,50 ± 6,16. Расчет корреляции между параметрами (гормоны) и уровень здоровья в исследуемых группах курсантов показал, что существует значимая положительная связь между уровнем здоровья и тестостероном (0,73), ТТГ (0,76), а также значимые отрицательные связи между уровнем здоровья и кортизолом (0,80), СТГ (0,66).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Айдаркин Е. К., Иваницкий Л. Н., Леднова М. И. и др. Валеология 2007, 1, 75-79.
2. Бородин Ю. И. Вестник лимфологии 2009, 4, 6-9.
3. Гаркави Л. Х., Квакина Е. Б. Валеология 1996, 2, 15
4. Маркина Л. Д., Маркин В. В. Тихоокеанский медицинский журнал 2008, 3, 30-36
5. Маркина Л. Д., Панченко Л. Л., Вижиж А. Е., Бессонова А. В. Физиология человека 2006, 32 (6), 63-67.

## THE ROLE OF INNATE IMMUNITY IN MAINTAINING OF THE STATE OF ADAPTATION IN THE FIRST YEAR CADETS OF HIGHER SCHOOL

Markina L. D., Rybina E. V.

GBUVPO "Vladivostok State Medical University", Vladivostok, Russia

Health Level of the first-year students from different faculties of the Maritime State University was evaluated and expressed in points by the program "Anti-stress" on the basis of leukocyte count, the integral index (the ratio of the number of segmented neutrophils to lymphocytes). The hormonal status was determined. The results showed that first-year students from all the faculties demonstrated the similar pattern in the prevalence of individuals with different levels of health. A distinctive feature of the mechanical faculty is lesser score within I and IV health level range.

---

---

## КОМПЛЕКСНАЯ ОЦЕНКА МИКРОФЛОРЫ МИНДАЛИН И ИММУННОГО СТАТУСА У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ТОНЗИЛЛИТОМ

Михайлова Е. А., Ермолина Е. В., Шульга И. А., Киргизова С. Б.,  
Федорова Т. О., Плакатина Н. В., Лившиц Н. М.

ГБОУ ВПО «Оренбургский государственный медицинский университет» Министерства  
здравоохранения Российской Федерации, Оренбург, Россия

В работе дана комплексная оценка микрофлоры миндалин и иммунного статуса у больных хроническим тонзиллитом. Тонзиллярная микрофлора представлена грампозитивными микроорганизмами, преимущественно, родов *Streptococcus* и *Staphylococcus*. Установлено снижение основных параметров Т-звена иммунной системы на фоне увеличения уровня В-лимфоцитов, содержания иммуноглобулинов IgA и IgG в слюне.

*Ключевые слова:* тонзиллит, микрофлора, клеточный и гуморальный иммунитет.

По современным представлениям одной из широко распространенных форм заболеваний в оториноларингологии являются острые и хронические тонзиллиты – воспалительная патология ЛОР-органов, связанная с дефицитом защитных антиинфекционных механизмов. Тесная взаимосвязь между макроорганизмом и микрофлорой часто не позволяет установить, что является первопричиной развития патологического состояния: изменения в состоянии иммунитета хозяина или сдвиги в составе микрофлоры. Формирование длительно текущих воспалительных процессов определяется не только взаимодействием макроорганизма с этиологически значимым микроорганизмом, но и участием ассоциативной микрофлоры, которое не ограничивается пассивным свидетельством развёртывающихся в биоценозе событий. Представители ин-

дигенной микрофлоры могут усиливать колонизационную резистентность биотопа, тогда как появление чуждых данному локусу видов микроорганизмов способствует воспалению и снижает эффективность применяемых лекарственных препаратов. Лекарственная терапия, безусловно, должна учитывать и микробиологические и иммунологические аспекты тонзиллярной проблемы. Вместе с тем в литературе крайне ограничено число исследований, посвященных комплексному изучению микрофлоры и иммунного статуса у больных хроническим тонзиллитом.

**Цель исследования** – оценить микрофлору миндалин, уровень иммуноглобулинов в слюне и иммунный статус больных хроническим тонзиллитом.

**Материалы и методы.** Проведено обследование 53 пациентов с хроническим тонзил-



литом в возрасте 18-30 лет. Материал для микробиологического исследования миндалин забирали при помощи стерильного тампона, прижимая корень языка стерильным шпателем. Проводилось выделение на элективных средах аэробных и факультативно-аэробных культур микроорганизмов с подсчетом показателей микробной обсемененности (ПМО) и последующей идентификацией при помощи стандартных тест-систем (LaChema, Чехия). При посеве на кровяной агар оценивалась гемолитическая активность изолятов.

Для оценки иммунного статуса у больных определялись показатели клеточного и гуморального иммунитета. Наряду с определением числа лейкоцитов и суммарных лимфоцитов в периферической крови, изучены субпулционный состав лимфоцитов (CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup>) в реакции иммунофлюоресценции с помощью моноклональных антител фирмы «Сорбент». Фагоцитарная и метаболическая активность сегментоядерных нейтрофилов периферической крови оценивалась по фагоцитарному показателю (ФП), фагоцитарному индексу (ФИ) и тесту восстановления нитросинего тетразолия (НСТ-тест). Содержание иммуноглобулинов классов А, М, G, sIgA определяли в слюне иммуноферментным методом с использованием наборов «Вектор Бест». Результаты обрабатывались статистически методами вариационной статистики с использованием пакета программ для ПК «Microsoft Excel». Достоверными считались различия при  $p < 0,05$ .

**Результаты и обсуждение.** При исследовании микробиоценоза миндалин было выделено 189 штаммов микроорганизмов, из которых 97 обладали гемолитической активностью. В основном (84%), тонзиллярная микрофлора была представлена грампозитивными микроорганизмами. Доминирующими таксонами были представители родов *Streptococcus* – *S. pneumoniae*, *S. salivarius*, *S. mitis*, *S. sanguis*, *S. viridians* (средний ПМО –  $10^3$  КОЕ/тампон) и *Staphylococcus* – *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. aureus* (средний ПМО –  $10^3$  КОЕ/тампон). Выделялись также бактерии родов *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Gemella*. Наиболее частыми представителями грамотрицательной микрофлоры изученного биотопа были: *Escherichia* – *E. coli* (ПМО – 10 КОЕ/тампон), *Neisseria spp.* (ПМО – 10 КОЕ/тампон), *Pseudomonas spp.* (ПМО – 10 КОЕ/тампон). Кро-

ме того, у 34 обследованных лиц изолированы грибы рода *Candida spp.* (ПМО –  $10^2$ - $10^3$  КОЕ/тампон). Микроорганизмы выделялись как в монокультуре (2%), так и в ассоциациях (98% случаев). Частыми ассоциантами нейссерий были *S. salivarius* (31% случаев), *S. aureus* (20%), *S. pneumoniae* (16%), *Candida spp.* (16%), *Pseudomonas sp.* (11%). Псевдомонады высевались вместе с *S. aureus* (50% случаев), *S. epidermidis* (20%), *S. haemolyticus* (14%), *S. salivarius* (11%), *S. pneumoniae* (25% случаев).

При оценке иммунного статуса пациентов установлено значимое повышение уровня лейкоцитов ( $7,0 \pm 0,23$  против  $6,22 \pm 0,19 \times 10^9$  в контроле), относительного ( $40,2 \pm 1,55$  против  $35,33 \pm 0,62\%$  в контроле) и абсолютного ( $2,86 \pm 0,13$  против  $2,19 \pm 0,07 \times 10^9$  в контроле) количества лимфоцитов, и напротив, достоверное уменьшение относительного количества с/я нейтрофилов соответственно ( $51,8 \pm 1,61$  против  $56,94 \pm 0,51\%$  в контроле).

При оценке фагоцитарной активности у больных тонзиллитом, выявлено увеличение значений ФИ ( $4,88 \pm 0,17$  против  $3,67 \pm 0,08$  в контроле) и стимулированного НСТ-теста ( $37,8 \pm 0,87$  против  $14,16 \pm 0,87\%$  в контроле).

Исследование Т-звена иммунной системы показало снижение основных ее параметров у больных тонзиллитом по сравнению с контролем. Так, было установлено снижение уровня относительного содержания CD3- ( $52,9 \pm 1,04$  против  $62,61 \pm 0,74\%$  в контроле), CD4- ( $37,9 \pm 0,97$  против  $42,12 \pm 0,71\%$  в контроле) и CD8- ( $21,9 \pm 0,79$  против  $24,24 \pm 0,43\%$  в контроле) лимфоцитов. Вместе с тем, у больных наблюдалась достоверная тенденция к увеличению относительного ( $16,7 \pm 0,65$  против  $14,22 \pm 0,46\%$  в контроле) и абсолютного ( $0,48 \pm 0,033$  против  $0,31 \pm 0,01 \times 10^9$  в контроле) уровня CD19-лимфоцитов, одного из главных параметров В-системы иммунитета.

Важно подчеркнуть, что увеличение уровня В-лимфоцитов в периферической крови сопровождалось достоверным повышением содержания иммуноглобулинов в слюне: IgA ( $0,14 \pm 0,009$  против  $0,07 \pm 0,002$  мг/мл в контроле) и IgG ( $0,048 \pm 0,005$  против  $0,007 \pm 0,0004$  мг/мл в контроле). Существенных изменений уровня IgM не установлено. Изменения концентрации sIgA в слюне имели тенденцию к некоторому снижению его уровня у больных тонзиллитом ( $208,4 \pm 16,3$  против  $245 \pm 23,0$  мг/л в контроле).

Таким образом, у больных тонзиллитом выявлен дисбаланс факторов естественной резистентности и Т-, В-систем иммунитета. Наличие высокого уровня обсемененности слизистой миндалин условно-патогенной микрофлорой с вирулентными свойствами может являться триггерным фактором развития дисбаланса иммунной системы с активацией гуморального иммунитета и, напротив, формированием Т-клеточной недостаточности [1, 2]. Увеличение показателей, характеризующих фагоцитарную и метаболическую активность нейтрофилов, свидетельствует об активации

факторов врожденного иммунитета в ответ на антигены микрофлоры миндалин. Полученные результаты могут быть использованы при решении вопросов о назначении иммуномодулирующей терапии пациентов с хроническим тонзиллитом.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Азнабаева Л. Ф., Арефьева Н. А. Вестник оториноларингологии 2013, 4, 4–9.
2. Черешнев В. А., Черешнева М. А. Медицинская иммунология 2011, 6, 557–568.

### COMPREHENSIVE EVALUATION MICROFLORA OF TONSILS AND IMMUNE STATUS IN PATIENTS WITH CHRONIC TONSILLITIS

Mikhailova E. A., Ermolina E. V., Shulga I. A., Kirgizova S. B., Fedorova T. O., Plakatina N. V., Livshits N. M.

Orenburg State Medical University, Orenburg, Russia

Summary. In this work the comprehensive assessment of tonsillar microflora and immune status in patients with chronic tonsillitis. Gram-positive tonsillar flora is represented by micro-organisms, mainly genera *Streptococcus* and *Staphylococcus*. A reduction in the main parameters of immune T-system level, with increased levels of B-lymphocytes of immunoglobulins IgA and IgG in saliva.

Keywords: tonsillitis, flora, cellular and humoral immunity.

### ИММУНОТРОПНОЕ ВЛИЯНИЕ ХРОМА НА ОРГАНИЗМ КРЫС ВИСТАР

Михайлова И. В., Анисимова Т. М.

ГБОУ ВПО «Оренбургский государственный медицинский университет Минздрава России», Оренбург, Россия

Иммунотропное влияние хрома на организм крыс Вистар проявлялось в наибольшей степени на 90-е и 135-е сутки эксперимента и выражалось в снижении: величин индексов (тимического, селезеночного) и содержания кариоцитов в данных органах, стандартизированных по массе тела и органа; числа CD3<sup>+</sup>-, CD4<sup>+</sup>-, CD8<sup>+</sup>- лимфоцитов, концентрации ИЛ-6 на фоне увеличения продукции ИЛ-4 в селезенке.

Ключевые слова: хром, иммунная система, эксперимент.

Иммунотропные свойства металлов обусловлены тем обстоятельством, что большинство из них участвуют в энзимных реакциях или способны нарушать функцию многочисленных ферментных систем, куда они входят в качестве коэнзимов. Среди тяжелых метал-

лов хром занимает одно из приоритетных мест, так как достаточно широко используется в промышленности, а также необходим для нормального протекания биохимических процессов [1]. Реакция иммунной системы на металлы зависит от дозы, экспозиции, вида ис-

следованных в эксперименте животных, пути поступления в организм, использовании моделей *in vivo* или *in vitro*.

**Целью работы** явилось исследование влияния хрома на параметры иммунной системы крыс Вистар.

Экспериментальные исследования проведены на 285 здоровых половозрелых крысах-самцах линии Вистар массой 250–300 г. Доза токсиканта соответствовала одной ПДК [2]. Все животные были разделены на 2 группы и содержались на стандартном пищевом рационе. Крысы 1-й группы (контроль) получали воду, 2-й группы вместе с питьевой водой – бихромат калия («Полихим», Россия) из расчёта 20 мг/кг. Через 45, 90 и 135 суток крысы выводились из эксперимента летальной дозой эфирного наркоза. В крови, тимусе, селезенке и костном мозге определяли число клеток в соответствии с лабораторными методами исследования экспериментальных животных [3]. Иммунофенотипирование спленоцитов проводили с использованием моноклональных антител («eBioscience», США) к рецепторам CD3, CD4, CD8. Процентное содержание CD3<sup>+</sup>-, CD4<sup>+</sup>-, CD8<sup>+</sup>- лимфоцитов селезенки определяли на проточном двухлазерном цитофлуориметре «FACS Canto II» («Becton Dickinson», США). Продукцию цитокинов в супернатантах нестимулированных и стимулированных конкавалином А (Кон А) культур спленоцитов (ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-10, ИФН $\gamma$ ) оценивали с использованием метода ИФА (тест-системы «Bender MedSystems», Австрия). Регистрацию результатов проводили на фотометре Multiskan (Labsystems, Финляндия). Результаты проведенных исследований обработаны методами вариационной статистики с использованием пакета программ для ПК «Microsoft Excel 7.0», «STATISTICA 10.0», включая методы параметрического (критерий Стьюдента-Фишера), непараметрического (критерий Манна-Уитни) анализов. Корреляционный анализ выполнен в рамках программы «Statistica for Windows 10.0». Для выделения значимых коэффициентов корреляции был выбран уровень значимости, принятый для медико-биологических исследований ( $p < 0,05$ ).

Исследование периферической крови крыс, подвергшихся воздействию хрома, показало отсутствие выраженных изменений числа лейкоцитов и лейкоцитарной формулы. В тоже время воздействие хрома на лимфоидные ор-

ганы крыс выражалось в уменьшении их массы и количества ядросодержащих клеток (ЯСК) в этих органах. Так, наиболее выраженные изменения установлены на 135 сутки экспериментального исследования и выражались в снижении массы тимуса ( $164 \pm 7$ , контроль –  $247 \pm 8$  мг) и селезенки ( $757 \pm 28$ , контроль –  $1042 \pm 20$  мг), а также количества клеток на орган: в тимусе ( $195 \pm 9$ , контроль –  $434 \pm 23 \times 10^6$ /орган) и селезенке ( $589 \pm 22$ , контроль –  $1031 \pm 30 \times 10^6$ /орган). В костном мозге снижение количества ядросодержащих клеток выявлено на 90 сутки экспозиции и составило  $70 \pm 1,31 \times 10^6$ /орган (контроль –  $79 \pm 3,12 \times 10^6$ /орган). Наряду с этим на 135 сутки установлены наиболее выраженные уменьшения: тимического индекса ( $0,62 \pm 0,04$ , контроль  $0,82 \pm 0,05$  мг/г), содержания ЯСК тимуса/массу тела ( $0,73 \pm 0,03$ , контроль  $1,45 \pm 0,10 \times 10^6$ /г) и ЯСК тимуса/массу органа ( $1,24 \pm 0,10$ , контроль  $1,80 \pm 0,09 \times 10^6$ /мг); количества ЯСК селезенки/массу тела ( $2,20 \pm 0,10$ , контроль  $3,40 \pm 0,18 \times 10^6$ /г) и ЯСК селезенки/массу органа ( $0,79 \pm 0,04$ , контроль  $1,01 \pm 0,03 \times 10^6$ /мг). Исследование субпопуляционного состава Т-лимфоцитов в селезенке крыс опытной группы выявило снижение числа CD3<sup>+</sup>-лимфоцитов ( $45,48 \pm 1,46$ , контроль  $48,50 \pm 0,83\%$ ), CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов ( $32,48 \pm 1,48$ , контроль  $37,50 \pm 0,8\%$ ), CD8<sup>+</sup>-лимфоцитов ( $10,04 \pm 1,87\%$ , контроль  $14,60 \pm 1,06\%$ ) наиболее выраженное на 90 сутки экспозиции. Изучение влияния хрома на секрецию цитокинов спленоцитами крыс показало, что индуцированная Кон А выработка указанных цитокинов спленоцитами крыс характеризовалась увеличением уровня ИЛ-4 с максимумом на 135 сутки ( $63,42 \pm 16,10$ , контроль  $4,58 \pm 0,86$  пг/мл) и снижении концентрации ИЛ-6 ( $83,48 \pm 12,25$ , контроль  $129,24 \pm 15,47$  пг/мл) наиболее выраженным также на 135 сутки. Наряду с установленными сдвигами в лимфоидных органах крыс, подвергшихся воздействию хрома, в ранее проведенных работах на аналогичной модели было установлено повышение интенсивности процессов свободного радикального окисления (СРО) крыс (сыворотка крови, селезенка, печень) и перекисного окисления липидов (ПОЛ) (селезенка, печень), на фоне снижения активности супероксиддисмутазы (СОД), каталазы и изменение уровня микроэлементов (МЭ) (снижение концентрации Си, никеля, Fe (кровь, печень), повышение содержания Cr (кровь, селезенка, печень)) [4]. Для

поиска связи между выявленными сдвигами иммунологических, биохимических параметров и содержанием МЭ в биосредах экспериментальных животных при воздействии хрома был проведен корреляционный анализ между уровнем МЭ в биосредах и иммунологическими, биохимическими параметрами. Так, дисбаланс Cu и Zn, развивающийся из-за поступления и кумуляции Cr, приводит также к снижению активности антиоксидантных ферментов, а именно, Cu-SOD и Zn-SOD, так как МЭ являются кофакторами металлоферментов. Поэтому активность SOD находится в прямой зависимости от содержания Zn и Cu, что подтверждается корреляционными связями, установленными между уровнем Cu и активностью SOD ( $r = \text{от } 0,36 \text{ до } 0,70$ ) и содержанием Zn и активностью SOD ( $r = \text{от } 0,30 \text{ до } 0,66$ ). Повышение содержания Cr находится в прямой зависимости между нарастанием уровня ДК и МДА, что подтверждается корреляционными связями, установленными между содержанием Cr и концентрацией ДК ( $r = \text{от } 0,34 \text{ до } 0,78$ ) и содержанием МДА ( $r = \text{от } 0,30 \text{ до } 0,89$ ). Генерация свободных радикалов играет ведущую роль в Cr – индуцированном апоптозе, под действием которых возникает значительное количество потенциально нерепарируемых повреждений ДНК. В результате чего активация апоптоза может быть причиной снижения субпопуляционного состава Т-лимфоцитов селезенки CD3-, CD4-,

CD-8-лимфоцитов. Поэтому число CD3-, CD4-, CD-8-лимфоцитов находится в обратной зависимости от содержания хрома, что подтверждается корреляционными связями, установленными между уровнем хрома и числом CD3-лимфоцитов ( $r = \text{от } -0,38 \text{ до } -0,82$ ), CD4-лимфоцитов ( $r = \text{от } -0,50 \text{ до } -0,68$ ), количеством CD-8-лимфоцитов ( $r = \text{от } -0,32 \text{ до } -0,48$ ). Таким образом, на основании результатов корреляционного анализа между содержанием МЭ в биосредах и иммунологическими, биохимическими параметрами можно прийти к заключению о том, что выявленные сдвиги параметров иммунной системы явились результатом влияния процессов СРО и изменения уровня микроэлементов.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Забродский П. Ф., Мандыч В. Г. Иммунотоксикология ксенобиотиков. СВИБХБ, Саратов 2007, 420.
2. ГН 2.1.5.2280-07 «Предельно допустимые концентрации (ПДК) химических веществ в воде водных объектов хозяйственно-питьевого и культурно-бытового водопользования». Роспотребнадзор, Москва 2008, 48.
3. Волчегорский И. А. Долгушин И. И., Колесников О. Л. Экспериментальное моделирование и лабораторная оценка адаптивных реакций организма. ЧГПУ, Челябинск 2000, 167.
4. Михайлова И. В., Чеснокова Л. А., Шарапова Н. А., Смолягин А. И., Красиков С. И. Гигиена и санитария 2014, 3, 71-74.

## IMMUNOTROPIC EFFECT OF CHROMIUM AT RATS WISTAR

Mihaylova I. V., Smolyagin A. I.

*SEI HPE "Orenburg State Medical University, Ministry of Health of Russia",  
Orenburg, Russia*

Immunotropic effect of chromium on the body of Wistar rats was shown to the greatest extent in the 90th and 135th day of the experiment and are expressed in reducing: index value (thymic, splenic) and nucleated cell content in these organs, standardized by body weight and body; the number of CD3<sup>+</sup> -, CD4<sup>+</sup> -, CD8<sup>+</sup> - lymphocyte IL-6 concentrations, with increased production of IL-4 in spleen.

*Key words:* chrome, immune system, experiment.

## УРОВЕНЬ С-РЕАКТИВНОГО БЕЛКА В ДИНАМИКЕ ЛЕЧЕНИЯ ДЕСТРУКТИВНЫХ ФОРМ ХРОНИЧЕСКОГО АПИКАЛЬНОГО ПЕРИОДОНТИТА

Мозговая Л. А., Быкова Л. П., Задорина И. И.,  
Годвалов А. П., Сайдазимов Б. Ш.

*ГБОУ ВПО Пермский государственный медицинский университет  
имени академика Е. А. Вагнера Минздрава России, Пермь, Россия*

В настоящей работе определена концентрация С-реактивного белка в периапикальном очаге у пациентов с деструктивными формами хронического апикального периодонтита, которая существенно повышается при обострении процесса и коррелирует с видом терапии. Использование комплексного лечения с применением медикаментозных и физических факторов способствует снижению выраженности воспалительного процесса.

*Ключевые слова:* С-реактивный белок, хронический апикальный периодонтит, Радент, инфракрасный лазерный свет.

**Актуальность и цель работы.** Воспалительный процесс в апикальном периодонте развивается, как следствие некроза пульпы и обусловлен поступлением инфекционно-токсического содержимого корневых каналов (КК) зубов через верхушечное отверстие. Именно факторы иммунной системы, участвующие в воспалительной реакции на границе корневой канал зуба-периодонт, являются ключевым звеном патогенеза хронического воспалительного процесса в периодонте, определяя местные тканевые реакции на воздействие патогенов. Известна корреляция между концентрацией эндотоксинов бактерий и уровнем белковых реактантов воспаления, из которых С-реактивный белок достоверно отражает как активность патофизиологического процесса, так и клиническое состояние больных [3].

**Цель исследования** – изучить концентрацию С-реактивного белка в периапикальном очаге при лечении деструктивных форм апикального периодонтита.

**Материалы и методы.** Проведено открытое проспективное рандомизированное контролируемое клинико-лабораторное исследование, в рамках которого 41 пациент с различными формами ХАП, в том числе: гранулирующая – 17, гранулематозная – 13, обострение – 11, которые в зависимости от вида терапии были разделены на две группы: 1-я группа – традиционное эндодонтическое лечение зубов с применением методики временного пломбирования корневых

каналов кальцийсодержащим препаратом «Радент» («Радуга Р», Россия), приготовленном на 2% растворе хлоргексидина; во 2-й группе вышеописанный метод лечения дополняли магнито-лазерной терапией. В качестве источника инфракрасного лазерного света с длиной волны 0,85–0,98 мкм применен полупроводниковый аппарат «Оптодан» (НПП «Венд», Россия), работающий в импульсном режиме и диапазоне частот 80-2000 Гц; выходная мощность до 4 Вт; дополнительная магнитная насадка обеспечивает магнитную индукцию не менее 50 мТл. Процедуру проводили с использованием «противовоспалительных» параметров на 1-м канале в проекции верхушек корней причинного зуба по переходной складке и на области корневых каналов зубов по 2 мин.

Всем пациентам проведено исследование содержимого периапикального очага в динамике лечения. Для забора материала применяли модификацию метода О. В. Беляевой и Н. Н. Кеворкова [1], суть которой состоит в следующем: стерильные бумажные штифты конусовидной формы диаметром 0,25 мм, применяемые в эндодонтии, помещали в корневой канал зуба, что позволяло получить содержимое из его наиболее узкой части и периапикальной области. Штифты пропитывались жидким содержимым периапикального очага в объеме 5 мкл, после чего их помещали в 1 мл физиологического раствора NaCl (первичное разведение материала составило 1:200). После тщательного диспер-

гирования пробы алиquotировались и хранились при температуре  $-18^{\circ}\text{C}$ . Концентрацию С-реактивного белка (СРБ) в исследуемых образцах определяли методом иммуноферментного анализа с использованием наборов реагентов ЗАО «Вектор-Бест» (Новосибирск).

Для статистической оценки полученных данных использовали парный и непарный варианты *t*-критерия Стьюдента.

**Результаты и обсуждение.** При исследовании содержимого периапикального очага до лечения определены следующие концентрации СРБ: при гранулематозной форме ХАП –  $0,067 \pm 0,007$  мг/л; гранулирующей –  $0,084 \pm 0,012$  мг/л, при обострении хронического процесса –  $0,222 \pm 0,070$  мг/л ( $p < 0,05$  к обеим формам ХАП). Среднее значение концентрации СРБ в периапикальном очаге при деструктивных формах ХАП составило  $0,150 \pm 0,025$  мг/л, которое принято за исходный фон. После проведения методики временного пломбирования КК зубов (через 7–10 суток) повторное исследование содержимого периапикального очага у пациентов обеих групп установило статистически значимое снижение концентрации СРБ: в 1-й группе –  $0,061 \pm 0,004$  мг/л, во 2-й –  $0,044 \pm 0,007$  мг/л ( $p < 0,05$  – по отношению к исходному фону;  $p > 0,05$  – между группами). В связи с тем, что корневой пломбировочный материал «Радент», приготовленный на 2% растворе хлоргексидина, обладает выраженным антибактериальным действием [4], можно предположить, что снижение микробной нагрузки в содержимом корневых каналов зубов при ХАП под влиянием медикаментозного лечения влечет за собой и изменение концентрации СРБ. Кроме того, магнито-лазерное излучение обладает усиленным противовоспалительным и противоотечным действием за счет вазоконстрикции сосудов и снижения проницаемости сосудистой стенки; активирует микроциркуляцию тканей пародонта за счет фибрино- и тромболитического действия, что также может оказывать положительное влия-

ние на уровень белковых реактантов воспаления в очаге поражения.

Сопоставляя полученные нами результаты, с данными по уровню СРБ в периапикальном очаге при ХАП, с таковыми в гингивальной жидкости и сыворотке крови пациентов при патологии периодонта, выяснилось, что в двух последних случаях они оказались выше, что указывает на активную реакцию со стороны системного иммунного ответа с участием гуморальных факторов врожденного иммунитета на общем и местном уровне [2, 5]. Однако концентрация СРБ в очаге воспаления при стандартном определении предположительно может быть занижена за счет связывания его с микроорганизмами и белками системы комплемента. В настоящей работе показано снижение концентрации С-реактивного белка в периапикальном очаге при деструктивных формах апикального периодонтита под влиянием лекарственных средств (кальций-содержащий препарат «Радент» и 2% раствор хлоргексидина) на 59,4%, а в случае комплексного применения медикаментозных и физических (магнито-лазерная терапия) факторов – на 70,7%. Данное обстоятельство указывает на уменьшение активности воспаления и регрессию патологического процесса, что может говорить об эффективном влиянии комплексного эндодонтического лечения на местные факторы гуморального иммунитета и корреляции их от вида терапии.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Беляева О. В., Кеворков Н. Н. Цитокины и воспаление 2002, 1 (4), 34-37.
2. Герасимова Л. П., Алетдинова С. М. Эндодонтия today 2014, 1, 6-9.
3. Кулинич С. Н., Юрченко И. И., Скрыль В. Ю. Ученые Записки УО ВГАВМ 2014, 50 (2,1), 168-171.
4. Мозговая Л. А., Задорина И. И., Быкова Л. П., Годовалов А. П. Саратовский научно-медицинский журнал 2013, 9 (3), 447-449.
5. Bhattacharyya K., Bandyopadhyay M., Karmakar B. C. et al. J Indian Med Assoc 2012, 110 (12), 920-925.

#### C-REACTIVE PROTEIN CONTENTS DURING THE TREATMENT OF CHRONIC APICAL PERIODONTITIS DESTRUCTIVE FORMS

Mozgovaya L. A., Bykova L. P., Zadorina I. I., Godovalov A. P., Saidazimov B.

*Sh. Acad. E. A. Wagner Perm State Medical University, Perm, Russia*

In the present study there were determined the concentrations of C-reactive protein in the periapical lesions in patients with destructive forms of chronic apical periodontitis, which significantly increased during the exacerbation of the process and depended on the type of therapy. The use of combined treatment with the use of medication and physical factors contribute to the reduction of the severity of the inflammatory process.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ АССОРТИМЕНТА АЛЛЕРГЕНОВ, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ДЛЯ ОКАЗАНИЯ СПЕЦИАЛИЗИРОВАННОЙ МЕДИЦИНСКОЙ ПОМОЩИ

Молокова М. Н.

*БГОУ ВПО «Курский государственный медицинский университет», Курск, Россия*

Проведен анализ официальных источников информации об аллергенах, используемых для диагностики и лечения аллергопатологии. Изучено потребление аллергенов на примере отделения аллергологии Курской областной клинической больницы. На основании полученных результатов предложены меры по улучшению фармацевтической помощи пациентам с аллергопатологией в условиях стационара.

*Ключевые слова:* аллергены, стационарные больные.

Организация иммунодиагностики и терапии аллергических заболеваний при оказании специализированной медицинской помощи подразумевает эффективное обеспечение лечебного процесса соответствующими фармацевтическими препаратами. С целью детальной оценки фармацевтического компонента оказания специализированной помощи в отделении аллергологии бюджетного медицинского учреждения «Курская областная клиническая больница» (БМУ «КОКБ») проведен качественный и количественный анализ ассортимента аллергенов, применяемых для диагностики и лечения аллергопатологии.

Методологическую основу исследования составили системный, ситуационно-логический анализ, маркетинговый анализ аллергенов, зарегистрированных в Российской Федерации.

В качестве объектов исследования использованы статистические показатели о госпитализации пациентов с аллергическим ринитом (АР) в отделение аллергологии БМУ «КОКБ» за 2009–2013 гг.; Государственный реестр лекарственных средств; истории болезни пациентов с аллергическим ринитом; расходные листы по медикаментам отделения аллергологии за 2009–2013 гг.

Удельный вес койко-дней пациентов аллергологического отделения, госпитализированных по поводу АР, оставался стабильным в течение последних лет и составлял от 14,5% до 19,7% в год. Принципиальные преимущества перед всеми методами лечения АР имеет патогенетическая терапия [1]. Условием эффективного проведения аллерген-специфической

иммунотерапии (АСИТ) является стабильная обеспеченность пациентов аллергенами в необходимом ассортименте и количестве.

На первом этапе исследования с помощью контент-анализа изучен ресурс зарегистрированных в России препаратов для проведения диагностики и патогенетической терапии аллергических заболеваний. Аллергены включены в фармакологическую группу «Диагностические средства», подгруппа «Иммунобиологические диагностические средства». По АТХ-классификации аллергены отнесены в группу «V – Прочие препараты», подгруппа «Аллергены». Установлено, что в настоящее время в Государственном реестре лекарственных средств имеются сведения о 8 международных непатентованных наименованиях (МНН) аллергенов, 109 торговых наименованиях и 152 лекарственных препаратах. Анализ по производственному признаку показал значительное преобладание препаратов отечественного производства (61,2%). Препараты аллергенов отечественных производителей (предприятия «Биомед АООТ им. И. И. Мечникова», Федерального государственного унитарного предприятия «Научно-производственное объединение по медицинским иммунобиологическим препаратам «Микроген») применяются в отечественной клинической практике более 10 лет и сохраняют актуальность своего использования в связи с достаточной эффективностью, большим накопленным опытом применения и относительно низкой стоимостью по сравнению с зарубежными аналогами. По способу применения аллергены подразделяются на инъекционные

и неинъекционные (71% и 29% соответственно). Среди лекарственных форм преобладают растворы для кожного скарификационного нанесения, внутрикожного и подкожного введения. Их доля составляет 71,1%. Самый низкий удельный вес (2,6%) приходится на подъязычные капли. Остальные препараты выпускаются в виде капель для приема внутрь (21,0%) и таблеток (5,3%). Сублингвальные капли Сталораль «Аллерген пыльцы березы» и Сталораль «Аллерген клещей», подъязычные таблетки ОралеЙр производства «АО Сталлержен» (Франция) характеризуются лучшим профилем безопасности. Однако факт импортного производства и высокая стоимость курса лечения (до 5000 и более рублей за одну упаковку) не позволяет широко применять данные препараты в условиях стационара с бюджетным финансированием.

Анализ расходов БМУ «КОКБ» на закупку аллергенов в 2009–2013 гг. показал, что доля денежных средств, затраченных на приобретение аллергенов, в лекарственном бюджете отделения аллергологии составляла от 4,8% в 2012 г. до 25,4% в 2013 г. Количество торговых наименований варьировало от 5 до 30, а соответствующее количество упаковок от 20 до 102. Отмечен рост стоимости одной упаковки в среднем за год на 27,2%.

Данные, полученные в результате анализа, свидетельствуют о неустойчивом финансировании статьи расходов на приобретение аллергенов. В существующих условиях приоритет финансирования при закупках медикаментов для бюджетных учреждений здравоохранения отводится лекарственным препаратам, зарегистрированным в перечне жизненно необходимых и важных лекарственных препаратов (ЖНВЛП) [2]. Несмотря на то, что АСИТ включена в клинические рекомендации, протокол ведения больных с АР с уровнем убедительности доказательств А и международные согласительные документы, аллергены не вхо-

дят в стандарты лечения и перечень ЖНВЛП. Поэтому приобретение препаратов данной фармакологической группы для нужд пациентов характеризуется нестабильностью.

Возможным выходом из этой ситуации является создание стандартов обеспечения лекарственными препаратами на уровне отдельных медицинских организаций. В соответствии с действующим законодательством [3] каждая организация обладает правом самостоятельной разработки и утверждения стандартов в форме нормативных документов, исходя из необходимости использования результатов исследований и разработок для совершенствования выполнения работ, в данном случае для оказания специализированной медицинской помощи. На основании изучения ассортимента аллергенов, закупаемых фармацевтической службой лечебного учреждения, и анализа данных Госреестра лекарственных средств рекомендовано включение аллергенов в базовый ассортимент МНН для стационарной медицинской помощи.

Таким образом, в целях совершенствования фармацевтической помощи пациентам с АР сформированы практические рекомендации для больничного формулярного комитета по включению аллергенов в формуляр и контролю со стороны фармацевтической службы лечебного учреждения за соотношением закупаемых противоаллергических препаратов и аллергенов для диагностики и лечения.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гушин И. С., Курбачева О. М. Аллергия и аллерген-специфическая иммунотерапия. – М.: Фармарус Принт Медиа, 2010. – 228 с.
2. Федеральный закон от 21.11.2011 № 323-ФЗ «Об основах здоровья граждан в Российской Федерации».
3. Федеральный закон от 27.12.2002 № 184-ФЗ «О техническом регулировании».

### RESULTS OF INVESTIGATION OF ALLERGEN ASSORTMENT USED FOR SPECIALIZED MEDICAL CARE

Molokova M. N.

*Kursk state medical university, Kursk, Russia*

Analysis of official information sources about allergens for the treatment and diagnostics of allergic diseases has been carried out. Consumption of allergens investigated for allergology department of Kursk regional clinical hospital. At the basis of the obtained results the measures for the improvement of pharmaceutical care for the in-patients with allergic diseases have been suggested.



## ЛЕПТИН И ГРЕЛИН РЕГУЛИРУЮТ ЭКСПРЕССИЮ ИНДОЛАМИН-2,3-ДИОКСИГЕНАЗЫ ДЕНДРИТНЫМИ КЛЕТКАМИ И ИММУНОСУПРЕССОРНЫХ МОЛЕКУЛ РЕГУЛЯТОРНЫМИ ЛИМФОЦИТАМИ

Орлова Е. Г., Логинова О. А., Ширшев С. В.

*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт  
экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь, Россия*

Изучено влияние лептина, грелина, и их комбинации, в концентрациях, отражающих уровень гормонов в периферической крови при беременности, на экспрессию фермента индоламин-2,3-диоксигеназы дендритными клетками и иммуносупрессорных молекул регуляторными лимфоцитами. Показано, что лептин в исследуемой концентрации усиливает, а грелин и комбинация гормонов не влияют на экспрессию индоламин-2,3-диоксигеназы дендритными клетками, а также GITR и CTLA-4 аллогенными регуляторными Т-лимфоцитами при их совместном культивировании. Созревающие в присутствии исследуемых гормонов ДК модулируют экспрессию GITR и CTLA-4 на регуляторных В-лимфоцитах при их совместном культивировании.

*Ключевые слова:* лептин, грелин, дендритные клетки, ИДО, регуляторные лимфоциты.

Пептидные гормоны лептин и грелин выступают антагонистами в регуляции основного обмена, обладают выраженной иммунорегуляторной активностью и играют важную роль в процессах гестации [1]. Ведущими факторами формирования иммунной толерантности при беременности являются увеличение доли толерогенных дендритных клеток (ДК) и регуляторных клеток с супрессорной активностью (Treg, Vreg). Толерогенные ДК за счет усиления активности индоламин-2,3-диоксигеназы (ИДО) и продукции толерогенных цитокинов, активируют формирование Treg [3]. Сами Treg благодаря экспрессии ряда ингибиторных молекул, как GITR (индуцированный глюкокортикоидами рецептор фактора некроза опухоли), CTLA-4 (антиген-4, ассоциированный с цитотоксическими Т-лимфоцитами), усиливают экспрессию ИДО в ДК [3]. Недавними исследованиями показана важная роль регуляторных В-лимфоцитов (Vreg) в формировании адаптивных Treg и созревании ДК.

**Цель работы** – исследовать влияние лептина и грелина, а также их комбинаций, в концентрациях, характерных для беременности, на экспрессию ИДО в ДК и иммуносупрессорных молекул на Treg и Vreg.

Объектами исследования являются ДК, генерированные из моноцитов периферической крови здоровых небеременных женщин репродуктивного возраста. Забор крови осуществлялся в фолликулярную фазу менструального цикла (1-7 день). Суспензию мононуклеаров (МПК) выделяли из периферической крови центрифугированием в градиенте плотности фиколл-верографина (1,077 г/см<sup>3</sup>). Генерацию ДК проводили по стандартной методике [3]. Суспензию МПК (1–5\*10<sup>6</sup>/мл) в полной питательной среде (ППС) (среда RPMI-1640 с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 1 мМ NERES, 2 мМ L-глутамин, 100 мкг/мл стрептомицин) засеивали на 24-луночные полистироловые планшеты («Costar», США) по 2 мл на лунку и инкубировали 3 ч при 37°C, в условиях 5% CO<sub>2</sub>. Не прилипшие МПК смывали с поверхности холодной средой RPMI-1640 и использовали для выделения целевых субпопуляций лимфоцитов. Далее в лунки вносили по 2 мл ППС и гормоны. Лептин («Sigma», США) использовали в концентрации 35 нг/мл, отражающей его содержание в периферической крови во II–III триместрах беременности [2]. Грелин («Sigma», Израиль) вносили в концентрации 1,25 нг/мл, сопоставимой с уровнем

гормона в периферической крови в I–II триместрах беременности [2]. Для исследования совместных эффектов гормоны в культуры добавляли одновременно (лептин 35 нг/мл + грелин 1.25 нг/мл). В контрольные пробы вместо гормонов вносили физиологический раствор, используемый для растворения гормона. Формирование ДК индуцировали добавлением GM-CSF (100 нг/мл, R&D, США) и IL-4 (20 нг/мл, BioLegend, США) [3]. Клетки инкубировали при 37°C в условиях 5% CO<sub>2</sub> в течение 5 сут. После 3-х сут меняли среду и повторно добавляли IL-4 и GM-CSF, гормоны, а также индуктор созревания ДК – ЛПС (1 мкг/мл, Escherichia coli serotype 0111: B4, Sigma) [3]. Через 5 сут оценивали количество ИДО в ДК методом иммуноферментного анализа коммерческим набором «ELISA Kit for Indoleamine-2,3-Dioxygenase (IDO), Cloud-Clone Corp, США» согласно инструкции производителя.

Способность созревающих в присутствии гормонов ДК модулировать экспрессию иммуносупрессорных молекул на регуляторных лимфоцитах оценивали при их совместном культивировании. Для этого к созревающим ДК на 5 сут культивирования вносили аллогенные Treg (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>bright</sup>T-лимфоциты), либо Breg (CD19<sup>+</sup>CD25<sup>bright</sup>B-лимфоциты), полученные методом иммуномагнитной сепарации соответствующими коммерческими наборами (DynaBeads Regulatory T cell Kit «Invitrogen», Norway; MagCelect Human B Cell Isolation Kit, R&D). Инкубировали еще 3 сут, затем клетки отмывали и оценивали экспрессию GITR и CTLA-4 на Treg и Breg методом проточной цитометрии соответствующими моноклональными антителами согласно инструкции производителя («eBioscience», США). Результаты выражали в виде средней арифметической и ее стандартной ошибки. Поскольку выборочное распределение данных было нормальным, достоверность различий между средними оценивали по парному *t*-критерию Стьюдента.

Показано, что лептин усиливает, а грелин и комбинация лептина с грелином не влияют на экспрессию ИДО в ДК (контроль –

1,60 ± 0,14, пг/мл; лептин, 35 нг/мл – 1,73 ± 0,14, пг/мл, *p*=0,02; лептин 35 нг/мл + грелин 1,25 нг/мл – 1,47 ± 0,18, пг/мл, *p*=0,05; грелин 1,25 нг/мл – 1,03 ± 0,45, пг/мл, *p*=0,19). Ранее нами показано, что лептин в концентрации II–III триместра беременности стимулирует, а грелин и комбинация гормонов не влияют на индуцированную активность ИДО в моноцитах периферической крови [4]. Таким образом, лептин в исследуемых концентрациях является важным регулятором активности ИДО моноцитов и генерированных из них ДК периферической крови. Одновременно показано, что лептин усиливает, а грелин и комбинация лептина с грелином не влияют на способность созревающих в их присутствии ДК модулировать экспрессию GITR и CTLA-4 на аллогенных Treg при их совместном культивировании с ДК (процент CD4<sup>+</sup>CD25<sup>bright</sup>T-лимфоцитов, экспрессирующих GITR и CTLA-4: контроль – 0,95 ± 0,11; лептин 35 нг/мл – 1,11 ± 0,17, *p*<0,05; лептин 35 нг/мл + грелин 1,25 нг/мл – 0,73 ± 0,34, *p*=0,27; грелин 1,25 нг/мл – 0,63 ± 0,18, *p*=0,09). Также в пилотных экспериментах показано, что созревающие в присутствии исследуемых гормонов ДК регулируют экспрессию GITR и CTLA-4 на Breg при их совместном культивировании.

Таким образом, лептин и грелин, в концентрациях, характерных для беременности, модулируют экспрессию ИДО в ДК и иммуносупрессорных молекул регуляторными лимфоцитами, что является одним из механизмов участия гормонов в формировании иммунной толерантности.

Работа поддержана грантом РФФИ 15-04-05670 а

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tena-Sempere M. Horm. Metab. Res. 2013, 45, 919-927.
2. Орлова Е. Г. Российский иммунологический журнал 2014, 8, (17–1), 16-19.
3. Талаев В. Ю., Матвейчев А. В., Ломунова М. А. и др. Иммунология 2010, 3, 125-131.
4. Ширшев С. В., Орлова Е. Г. Вестн. ур. мед. акад. науки 2011, 4 (1), 16-19.

## LEPTIN AND GHRELIN REGULATE INDOLEAMINE-2,3-DIOXYGENASE EXPRESSION IN DENDRITIC CELLS AND IMMUNOSUPPRESSIVE MOLECULAR EXPRESSION ON REGULATORY CELLS

Orlova E. G., Shirshov S. V., Loginova O. A.

*Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Russian Academy of Science,  
Ural Branch, Perm, Russia*

The influence of leptin and ghrelin, and their combined effects at concentrations characteristic for pregnancy, on indoleamine-2,3-dioxygenase expression in dendritic cells and immunosuppressive molecules on regulatory lymphocytes is investigated. It was shown that leptin enhances, but ghrelin and hormone combinations do not influence on the expression of indoleamine-2,3-dioxygenase in dendritic cells and GITR and CTLA-4 expression on regulatory lymphocytes. Investigated hormones modulate the expression of GITR and CTLA-4 molecules on regulatory B-lymphocytes cultivated with allogeneic DCs matured in the presence of leptin and ghrelin.

*Keywords:* leptin, ghrelin, dendritic cells, indoleamine-2,3-dioxygenase, regulatory cells.

---

---

## ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ КОНЦЕНТРАЦИЙ ПАРАТИРЕОИДНОГО ГОРМОНА НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛОВ

Осиков М. В., Черепанов Д. А.

*ГБОУ ВПО ЮУГМУ Минздрава России, Челябинск, Россия*

Дисфункция фагоцитов при хронической почечной недостаточности и других состояниях, сопровождающихся гиперпаратиреозом, может быть обусловлена эффектами паратиреоидного гормона (ПТГ), рецепторы для которого обнаружены на различных лейкоцитах. Для проверки гипотезы исследовали влияние ПТГ в концентрациях  $50 \cdot 10^{-9}$  г/мл;  $500 \cdot 10^{-9}$  г/мл и  $5000 \cdot 10^{-9}$  г/мл (100%, 1000%, 10000% от его нормального уровня в сыворотке) на показатели поглотительной способности и генерации активных форм кислорода (АФК) изолированными нейтрофилами здоровых людей после 30 мин инкубации при 37°C. Установлено, что ПТГ активирует функциональную активность изолированных нейтрофилов клинически здоровых людей. Эффект ПТГ нарастает с увеличением дозы при регистрации активности, интенсивности фагоцитоза, фагоцитарного числа, спонтанного НСТ-теста.

*Ключевые слова:* паратиреоидный гормон, нейтрофилы, фагоцитоз, НСТ-тест.

Повышение концентрации паратиреоидного гормона (ПТГ) в крови является следствием его избыточного синтеза и секреции паратиреоцитами при гиперпаратиреозе различного генеза. Вторичный гиперпаратиреоз и сопутствующие изменения фосфорно-кальциевого гомеостаза являются частым осложнением терминальной стадии хронической почечной недостаточности (ХПН). Ранее нами продемонстрировано изменение врожденного иммунитета при ХПН, в том числе активация функциональной

активности фагоцитов [1,2]. В патогенезе дисфункции фагоцитов при ХПН имеют значение азотемия, нарушение обмена железа, анемия, гемодиализная процедура и др. факторы [3]. Плейотропные эффекты ПТГ, не связанные с регуляцией минерального обмена, направленные на гемопоэз, иммунный статус, регуляцию углеводного и липидного обмена, сосудистого тонуса и др., являются объектом пристального внимания многих исследователей [5]. Полагаем, что ПТГ может вносить вклад в изменение

функции фагоцитов при ХПН и др. состояниях, сопровождающихся гиперпаратиреозом. В литературе представлены неоднозначные сведения о влиянии ПТГ на функциональные способности эффекторов врожденного иммунитета, что может быть обусловлено использованием различных доз ПТГ, цельной крови или выделенных лейкоцитов человека и различных животных (крыса, мышь, бык), клеточных линий в интактных условиях или при различной патологии.

**Цель работы** – в условиях *in vitro* исследовать влияние различных концентраций ПТГ на функциональное состояние нейтрофилов периферической крови.

**Материалы и методы.** Исследование выполнено с использованием нейтрофилов 10 клинически здоровых людей-доноров. К 100 мкл суспензии нейтрофилов ( $5 \cdot 10^6$  клеток/мл) добавляли 100 мкл ПТГ в концентрациях 0 г/мл (контроль);  $50 \cdot 10^{-9}$  г/мл;  $500 \cdot 10^{-9}$  г/мл и  $5000 \cdot 10^{-9}$  г/мл, что соответствует 0%, 100%, 1000%, 10000% от его нормальной концентрации в сыворотке. После 30 минут инкубации в условиях термостата при 37°C оценивали функциональную активность нейтрофилов. Учитывали активность, интенсивность фагоцитоза и фагоцитарное число, проводили НСТ-тест, с расчетом активности, интенсивности и функционального резерва клеток. Для оценки различий между группами использовали парный критерий Вилкоксона, при проведении корреляционного анализа – коэффициент корреляции Спирмена (R).

**Результаты исследования.** Добавление к суспензии нейтрофилов ПТГ в концентрации  $50 \cdot 10^{-9}$  г/мл приводит к повышению интенсивности фагоцитоза ( $0,89 \pm 0,14$  у.е.; в контроле  $0,70 \pm 0,11$  у.е.;  $p < 0,05$ ) и фагоцитарного числа ( $2,93 \pm 0,29$  у.е.; в контроле  $2,55 \pm 0,15$  у.е.;  $p < 0,05$ ). ПТГ в концентрации  $500 \cdot 10^{-9}$  г/мл увеличивает поглотительную способность по показателям активности фагоцитоза ( $34,80 \pm 3,76\%$ ; в контроле  $27,00 \pm 2,97\%$ ;  $p < 0,05$ ), интенсивности фагоцитоза ( $1,13 \pm 0,21$  у.е.;  $p < 0,05$ ), фагоцитарного числа ( $3,15 \pm 0,31$  у.е.;  $p < 0,05$ ), а также генерацию активных форм кислорода (АФК) по показателям активности спонтанного НСТ-теста ( $21,20 \pm 2,96\%$ ; в контроле  $14,20 \pm 2,54\%$ ;  $p < 0,05$ ), активности индуцированного НСТ-теста ( $25,80 \pm 3,58\%$ ; в контроле  $18,60 \pm 3,49\%$ ;  $p < 0,05$ ), интенсивности индуцированного НСТ-теста ( $0,30 \pm 0,04$  у.е.; в контроле  $0,21 \pm 0,04$

у.е.;  $p < 0,05$ ). Контакт нейтрофилов с ПТГ в дозе  $5000 \cdot 10^{-9}$  г/мл увеличивает показатели поглотительной способности: активность фагоцитоза ( $42,00 \pm 3,31\%$ ;  $p < 0,05$ ), интенсивность фагоцитоза ( $1,43 \pm 0,1$  у.е.;  $p < 0,05$ ), фагоцитарное число ( $3,34 \pm 0,22$  у.е.;  $p < 0,05$ ) и показатели генерации АФК фагоцитами: активность спонтанного НСТ-теста ( $26,00 \pm 2,76\%$ ;  $p < 0,05$ ), интенсивность спонтанного НСТ-теста ( $0,29 \pm 0,03$  у.е.; в контроле  $0,18 \pm 0,05$  у.е.;  $p < 0,05$ ), активность индуцированного НСТ-теста ( $27,60 \pm 4,18\%$ ;  $p < 0,05$ ), интенсивность индуцированного НСТ-теста ( $0,30 \pm 0,05\%$ ;  $p < 0,05$ ). ПТГ во всех используемых дозах не оказывал значимого влияния на функциональный резерв нейтрофилов. С использованием корреляционного анализа установлено наличие прямой средней силы связи между дозой ПТГ (0;  $50 \cdot 10^{-9}$  г/мл;  $500 \cdot 10^{-9}$  г/мл;  $5000 \cdot 10^{-9}$  г/мл) и показателями активности фагоцитоза ( $R = 0,63$ ;  $p < 0,05$ ), интенсивности фагоцитоза ( $R = 0,67$ ;  $p < 0,05$ ), фагоцитарного числа ( $R = 0,47$ ;  $p < 0,05$ ), активности спонтанного НСТ-теста ( $R = 0,61$ ;  $p < 0,05$ ), интенсивности спонтанного НСТ-теста ( $R = 0,47$ ;  $p < 0,05$ ).

Известно, что на мембране гранулоцитов и в меньшей степени – моноцитов и лимфоцитов экспрессируется тип 2 рецептора ПТГ (PTH2R), однако у пациентов с гиперпаратиреозом экспрессия PTH2R на лейкоцитах снижена в зависимости от уровня ПТГ в плазме [4]. Внутриклеточные сигнальные пути ПТГ включают традиционные Gs- и Gq-белок-ассоциированные дифференциации, в том числе цАМФ/протеинкиназа А, фосфолипаза С, протеинкиназа С, ионизированный кальций. Полагаем, что ключевым механизмом активации функциональной активности нейтрофилов под влиянием ПТГ выступает накопление кальция в цитоплазме.

Таким образом, ПТГ активизирует функциональную активность изолированных нейтрофилов клинически здоровых людей: в дозе  $50 \cdot 10^{-9}$  г/мл повышается поглотительная способность нейтрофилов, в дозах  $500 \cdot 10^{-9}$  г/мл и  $5000 \cdot 10^{-9}$  г/мл – поглотительная способность и генерация АФК нейтрофилами. Эффект ПТГ нарастает с увеличением дозы при регистрации активности, интенсивности фагоцитоза, фагоцитарного числа, спонтанного НСТ-теста.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Осиков, М.В., Телешева Л. Ф., Агеев Ю. И. и др. // Современные проблемы науки и образова-

- ния.– 2013.– № 5.– URL: www.science-education.ru/111-9998 (дата обращения: 30.03.2015).
2. Осиков М. В., Телешева Л. Ф., Агеев Ю. И. и др. // Современные проблемы науки и образования.– 2013.– № 4.– URL: www.science-education.ru/110-9973 (дата обращения: 30.03.2015).
  3. Cohen G., Hörl W. H. // Toxins (Basel).– 2012.– Vol. 24, № 4 (11).– P. 962-990.
  4. Seeliger S., Hausberg M., Eue I. et al. // Clin Nephrol.– 2003.– Vol. 59 (6).– P. 429-435.
  5. Nikodimopoulou M., Liakos S. // Hippokratia.– 2011.– Vol. 15, Suppl. 1.– P. 33-38.

## EFFECT OF DIFFERENT CONCENTRATIONS OF PARATHYROID HORMONE ON NEUTROPHIL FUNCTIONAL ACTIVITY

Osikov M. V., Cherepanov D. A.

*South Ural State Medical University, Russian Ministry of Health, Chelyabinsk, Russia*

Phagocyte dysfunction in chronic renal failure and other conditions accompanied by hyperparathyroidism may be due to effects of parathyroid hormone (PTH), which receptors are found on various leukocytes. To verify the hypothesis we investigated the effect of PTH in concentrations of  $50 \cdot 10^{-9}$  g/ml;  $500 \cdot 10^{-9}$  g/ml and  $5000 \cdot 10^{-9}$  g/ml (100%, 1000%, 10,000% of the normal level in the serum) on phagocytic capacity and generation of reactive oxygen species by healthy isolated neutrophils after 30 min incubation at 37 °C. It was found that PTH activates the functional activity of isolated neutrophils of healthy individuals. The effect of PTH increases with increasing dose during registration activity, the intensity of phagocytosis, phagocytic number, spontaneous NBT-test.

## ИММУННЫЙ СТАТУС И ПОВЕДЕНЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ДЕСИНХРОНОЗЕ В УСЛОВИЯХ ЛЮМИНЕСЦЕНТНОГО ОСВЕЩЕНИЯ

Осиков М. В.<sup>1</sup>, Гизингер О. А.<sup>2</sup>, Огнева О. И.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Научно-образовательный центр «Проблемы фундаментальной медицины»,

<sup>2</sup>Кафедра микробиологии, вирусологии, иммунологии и клинической лабораторной диагностики ГБОУ ВПО Южно-Уральский государственный медицинский университет Минздрава России, Челябинск, Россия.

Следствием десинхронизации циркадианных ритмов могут быть дефицит когнитивной функции, нарушения внимания, адекватной поведенческой активности, связанные с изменением иммунного ответа. Цель работы – оценить состояние иммунного статуса и поведенческой активности у лабораторных животных при экспериментальном десинхронозе в условиях люминесцентного освещения. Исследование выполнено на 138 половозрелых морских свинках. Световой десинхроноз создавали путём содержания животных при круглосуточном освещении в течение 30 суток. Установлено, что при экспериментальном десинхронозе в условиях люминесцентного освещения на 20 и 30 сутки наблюдается подавление Th1- и Th2-зависимого иммунного ответа. Десинхроноз сопровождается снижением концентрации в плазме ИЛ-4, ИФН-гамма. Отмечается ухудшение когнитивной функции, усиление тревожности животных, угнетение ориентировочно-исследовательской активности.

*Ключевые слова:* десинхроноз, иммунитет, поведение, когнитивная функция.

**Актуальность.** Изменение естественного ритма смены дня и ночи в связи с чрезмерным использованием искусственных источников освещения может приводить к возникновению десинхроноза [1]. Следствием десинхро-

низации циркадианных ритмов могут быть дефицит когнитивной функции, нарушения внимания, адекватной поведенческой активности, связанные с изменением иммунного ответа.

**Цель работы** – оценить состояние иммунного статуса и поведенческой активности у лабораторных животных при экспериментальном десинхронозе в условиях люминесцентного освещения.

**Материалы и методы.** Работа выполнена на 138 нелинейных половозрелых морских свинок массой  $300 \pm 50$  г, которых содержали в стандартных помещениях вивария и случайным образом распределили на 2 группы. Группа 1 ( $n=72$ ) – животные, находящиеся под действием стандартного фиксированного люминесцентного освещения (СФЛО) (12 ч свет/12 ч темнота), цветовая температура 4500 К. Группа 2 ( $n=66$ ) – десинхроноз в условиях люминесцентного освещения (ЛО). Световой десинхроноз создавали путём содержания лабораторных животных при круглосуточном освещении. Продолжительность эксперимента составила 30 суток. Оценку показателей осуществляли на 10, 20 и 30 сутки. Th1-зависимый иммунный ответ исследовали по интенсивности реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ), Th2-зависимый иммунный ответ оценивали по количеству антителообразующих клеток (АОК) в селезенке после иммунизации аллогенными эритроцитами. Методом иммуноферментного анализа на аппарате «Иммулайт 2000» (США) определяли в сыворотке концентрацию интерлейкина – 4 (ИЛ-4), интерферона-гамма (ИФН-гамма) с помощью специфичных для морских свинок тест-систем «USCN Life Science Inc.» (Китай). В тесте «открытое поле» регистрировали горизонтальную активность (ГА), вертикальную активность (ВА), исследовательскую активность (ИА), число актов груминга (ГР), количество фекальных болюсов (ФБ). В тесте «водный лабиринт Морриса» животными осуществлялся поиск скрытой под водой платформы. Регистрировали время нахождения платформы и траекторию движения. Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакета программ «Statistica v. 10.0 for Windows».

**Результаты исследования.** При исследовании адаптивного иммунитета отмечено на 20 и 30 сутки эксперимента снижение интенсивности реакции ГЗТ и уменьшение абсолютного и относительного количества АОК в селезенке лабораторных животных, что свидетельствует об угнетении Th1- и Th2-зависимого иммунного ответа. При оценке цитокинового профиля в крови выявлено снижение концентрации

ИЛ-4 на 10 сутки ( $16,00 \pm 2,86$  пг/мл; в контроле  $26,24 \pm 3,56$  пг/мл), 20 сутки ( $15,23 \pm 3,02$  пг/мл; в контроле  $21,75 \pm 1,99$  пг/мл;  $p < 0,05$ ) и 30 сутки ( $14,18 \pm 1,71$  пг/мл; в контроле  $18,02 \pm 1,06$  пг/мл;  $p < 0,05$ ), снижение концентрации ИФН- $\gamma$  на 20 сутки ( $5,11 \pm 0,92$  пг/мл; в контроле  $9,76 \pm 2,17$  пг/мл;  $p < 0,05$ ) и 30 сутки ( $4,07 \pm 0,35$  пг/мл; в контроле  $7,15 \pm 1,91$  пг/мл;  $p < 0,05$ ).

При проведении теста «открытое поле» в условиях десинхроноза на 10 сутки отмечается увеличение числа актов ГР и снижение ИА, что является признаком изменения эмоциональной реакции. На 20 сутки наблюдается подавление ИА и повышение числа ФБ, что может отражать общее беспокойство. На 30 сутки отмечается повышение ГА и количества ФБ, что может указывать на усиление общего уровня тревожности животных.

При тестировании когнитивной функции с помощью водного лабиринта Морриса в условиях десинхроноза выявлено, что на 10 сутки исследования удлиняется время нахождения платформы на 4 день проведения методики. На 20 сутки – увеличение времени в 1 и 2 дни. На 30 сутки эксперимента временной промежуток больше со 2 по 4 дни проведения теста.

Длина траектории – фактор, зависимый только от ориентации в пространстве и памяти животных. Длина траектории поиска скрытой платформы на 10 сутки эксперимента не отличается от группы СФЛО. На 20 сутки, длина траектории с 1 по 3 день больше чем в группе СФЛО. На 30 сутки – больше во все дни проведения методики. Можно сделать заключение о том, что время нахождения платформы осуществлялось за счет двигательной активности животных, а не за счет способности к ориентации в пространстве.

Снижение ориентировочно-исследовательской активности животных и параллельно с этим угнетение когнитивной функции к 30 суткам можно объяснить тем, что круглосуточное освещение подавляет выработку мелатонина эпифизом, недостаток которого способствует повышению уровня катехоламинов в крови, что может являться дополнительным фактором, реализующим проявления стрессовой реакции. Отмечено, что при хроническом стрессе под действием катехоламинов снижается сигнализация нейронов в гиппокампе, что способствует дефициту когнитивной функции [2]. Ухудшение памяти можно связать со снижением уровня мелатонина, оказываю-

щего модулирующее действие на нейрогенез в гиппокампе, через экспрессию рецепторов к нему на нейронах гиппокампа [3]. Отмечено, что в гиппокампе экспрессируются рецепторы к ИФН-гамма и ИЛ-4, поэтому изменение концентрации данных цитокинов в плазме, может влиять на когнитивную функцию [4, 5].

Таким образом, при экспериментальном десинхронозе в условиях люминесцентного освещения на 20 и 30 сутки угнетается Th1-Th2- зависимый иммунный ответ, на 10, 20, 30 сутки снижается концентрация ИЛ-4, на 20, 30 сутки снижается концентрация ИФН-гамма. На 30 сутки отмечается ухудшение когнитив-

ной функции, усиление тревожности животных, угнетение ориентировочно-исследовательской активности.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Erren T. C., Reiter R. J. // *Med. Hypotheses*. – 2009. – Vol. 73 (4). – P. 537-541.
2. Alfarez D. N., Joëls M., Krugers H. J. // *Eur. J. Neurosci*. – 2003. – Vol. – 17 (9). – P. 1928-1934.
3. Musshoff U., Riewenherm D., Berger E. Et al. // *Hippocampus*. – 2002. – Vol. 12. – P. 165-173.
4. Litteljohn D., Nelson E., Hayley S. // *Front. Cell. Neurosci*. – 2014. Vol. – 20 (8). – P. art. 391 (1–14).
5. Nolan Y., Maher F. O., Martin D. S., et al. // *J. Biol. Chem*. – 2005. Vol. – 280 (10). P. 9354-9362.

### IMMUNE STATUS AND BEHAVIORAL ACTIVITY IN EXPERIMENTAL DESYNCHRONOSES UNDER FLUORESCENT LIGHTING CONDITIONS

Osikov M. V.<sup>1</sup>, Gizinger O. A.<sup>2</sup>, Ogneva O. I.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Research and Education Center of Basic Medicine Issues, <sup>2</sup>Department of Microbiology, Virology, Immunology and Clinical Laboratory Diagnostics South Ural State Medical University, Russian Ministry of Health, Chelyabinsk, Russia

The consequences of desynchronization of circadian rhythms may be deficiency in cognitive function, attention deficit disorder, and adequate behavioral performance disorder associated with changes in the immune response. The purpose of this work is to assess the condition of the immune status and behavioral activity in laboratory animals in experimental desynchronosis under the conditions of fluorescent lighting. The research was performed on 138 sexually mature guinea pigs. Photodesynchronosis was achieved by keeping the animals under continuous light for 30 days. It was determined, that in experimental desynchronosis under the conditions of fluorescent lighting, suppression of Th1- and Th2-dependent immune response is observed on the 20th and 30th days. Desynchronosis is accompanied by reduction of IL-4 and IFN-gamma concentration in the plasma. The deterioration of cognitive function, increased anxiety in animals, and suppression of orienting-exploratory activity are registered.

### ЭНДОТЕЛИАЛЬНАЯ МОДЕЛЬ ИДИОПАТИЧЕСКОГО ФИБРОЗА ЛЕГКИХ ПРИ БУЛЛЕЗНОЙ БОЛЕЗНИ ЛЕГКИХ

Пустоветова М. Г., Чикинев Ю. В., Пионтковская К. А.,  
Дробязгин Е. А., Самсонова Е. Н.

ГБОУ ВПО Новосибирский государственный медицинский университет  
Минздрава РФ, Новосибирск, Россия

В статье рассматривается модель идиопатического фиброза легких, основным звеном патогенеза которого является дисбаланс клеточного пускового фактора ангиогенеза, развивающийся под воздействием повышенного синтеза цитокинов. Настоящее исследование соотносит механизм развития буллезной болезни легких с новым механизмом развития идиопатического фиброза легких, учитывая способы хирургической коррекции буллезной болезни легких.

*Ключевые слова:* буллезная болезнь легких, фиброз, TGF-β1, VEGF.

**Актуальность исследования.** В современной литературе последних лет все больше говорится о том, что одним из основных факторов патогенеза фиброза легких, является формирующаяся дисфункция эндотелия сосудов, возникающая как ответная реакция на воздействие повреждающих факторов таких как, гипоксия, активация свободно-радикальных процессов, увеличение синтеза провоспалительных цитокинов и факторов роста [1, 5]. Фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) был выделен как его важный регулятор и главный усилитель проницаемости сосудов и в нескольких видах воспалительных изменений. Его основные биологические функции реализуются при взаимодействии с двумя видами клеточных рецепторов VEGFR1 (Flt-1) и VEGFR2/KDR (Flk-1), на эндотелиальных клетках. В процессе ремоделирования легочной ткани имеет значение взаимодействие с Flk-1 рецептором. Кроме основных эффектов, VEGF служит митогенным агентом и хемоаттрактантом для эндотелиоцитов [3, 4], способен фиксировать лейкоциты в месте воспаления, неоваскуляризации и в месте повреждения сосудистой стенки путем стимулирования экспрессии моноцитарного хемотаксического протеина. VEGF регулирует морфологию эндотелиальной клетки и активирует множественные пути передачи сигнала, включая экстрацеллюлярную сигнал-регулирующую киназу [2, 3], которая вовлечена в регуляцию ангиогенеза и воспалительного ответа в легких. TGF- $\beta$ 1 индуцирует гибель эпителиальных клеток или ответ клеток легкого на травмирующее воздействие, вслед за которым развивается фиброз ткани. Также TGF- $\beta$ 1 стимулирует экспрессию VEGF в фибробластах человеческого легкого через Smad3 сигнальный путь. На сегодняшний день буллезная болезнь легких не имеет однозначного основного патогенетического механизма, как и большинство фиброзирующих органоспецифических заболеваний, и не исключает иммунологической поломки в течении процессов фиброзирования.

**Цель.** Соотнести механизм развития буллезной болезни легких с новыми механизмом развития идиопатического фиброза легких, учитывая способы хирургической коррекции буллезной болезни легких.

**Материал и методы.** В настоящее исследование были включены 38 пациентов с буллезной болезнью легких, находящихся на лече-

нии в торакальном отделении Новосибирской Областной Клинической Больницы. Данное исследование является контролируемым, нерандомизированным, поперечным, когортным исследованием. Все пациенты по способу оперативного лечения были разделены на 2 группы. 1 группа – торакоскопия, иссечение булл с плеврэктомией (20 пациентов), 2 группа – торакотомия, иссечение булл с плеврэктомией, (18 пациентов). Все пациенты не имели каких-либо сопутствующих заболеваний, требовавших диспансерного наблюдения. Способ оперативного лечения выбирался на основании проводимого дообследования и возможности проведения однологочной вентиляции (торакоскопия) и доступности булл для деструкции и резекции.

Основные критерии включения: наличие данных компьютерной томографии органов грудной клетки с характерной рентгенологической картиной поражения легких и плевры и/или наличие спонтанного пневмоторакса в анамнезе и/или рецидивирующих пневмотораксов; выполненное оперативное лечение в объеме торакоскопии или торакотомии; плеврэктомии и иссечения булл в отделении торакальной хирургии.

Объект исследования: плазма крови полученная центрифугированием не менее 10 минут с ускорением 4000 G с последующим выполнением иммуноферментного анализа.

**Результаты и их обсуждение.** У пациентов, включенных в настоящее исследование, уровень VEGF был достоверно выше нормативных значений, как до начала оперативного лечения, так и после его проведения. Максимальное увеличение концентрации отмечалось на 5 сутки после оперативного лечения. Следует отметить, что наиболее высокие концентрации были выявлены у пациентов 1-й группы. Возможно предположить, что повышение уровня VEGF у данных пациентов связано со сниженным давлением его экспрессии TGF- $\beta$ 1. Повышение концентрации VEGF с 1 на 5 сутки было достоверным в 1 группе ( $p=0.018$ ), как и во второй группе ( $p=0.01$ ). Следовательно, у пациентов, вошедших в 1-ю группу наблюдается менее интенсивное течение процессов фиброзирования после оперативного лечения, что может быть связано с повреждением меньшего объема тканей при торакоскопии.

Основным регулирующим фактором в идиопатическом фиброзе является TGF- $\beta$ 1, который



стимулирует дифференцировку фибробластов в миофибробласты, а также стимулирует излишнюю продукцию экстрацеллюлярного матрикса. По результатам настоящего исследования выявлено, что способ хирургического лечения пациентов достоверно влияет ( $p=0.02$  в группе торакотомии,  $p=0.04$  в группе торакоскопии) на содержание в плазме фактора дифференцировки фибробластов.

Процессы трансформации легочной ткани у пациентов, которым выполнялась торакоскопия, в послеоперационном периоде протекают менее интенсивно, и при этом TGF- $\beta$ 1 не осуществляет подавление экспрессии VEGF, а стимулирует ее, что противоречит одной из современных моделей идиопатического фиброза легких, и также указывает на процесс повреждения и проницаемости эндотелия сосудов легочной ткани.

Корреляционный анализ содержания VEGF и TGF- $\beta$ 1 в группе пациентов с торакотомией выявил наличие обратно пропорциональной взаимосвязи со значением  $r=0.522$ , меняющей свою силу до прямо пропорциональной связи со значением  $r=0.722$  на 5 сутки после операции, что может интерпретироваться как активное течение процессов фиброобразования в ранний послеоперационный период с последующим замедлением данного процесса в послеоперационный период, однако при этом сохраняется выраженная повышенная проницаемость сосудов за счет увеличения содержания VEGF.

В группе пациентов с использованием основного метода оперативного лечения – торакоскопии до начала лечения наблюдается достоверная прямо пропорциональная корреляционная взаимосвязь VEGF и TGF- $\beta$ 1 со значением  $r=0.467$ . В этой группе после проведенного лечения корреляционная взаимосвязь остается

прямой, но увеличивается ее сила до значения  $r=0.864$ , что также является указателем на выраженную повышенную проницаемость сосудов за счет увеличения содержания VEGF.

Таким образом, приняв модель идиопатического легочного фиброза как фундаментальную в трактовании процессов фиброобразования у пациентов с буллезной болезнью легких, можно предположить, что до начала оперативного лечения у пациентов, с торакотомией имелось характерное для идиопатического фиброза легких отсутствие супрессии VEGF, формирующейся высокими концентрациями TGF- $\beta$ 1 в плазме крови. Следовательно, down-регуляция у этой группы пациентов была недостаточной.

Механизм данного явления подлежит дальнейшему изучению с изучением дополнительного спектра цитокинов, характерного для развития фиброза легких. Эндотелиальная модель идиопатического фиброза легких может быть применима к модели буллезной болезни легких, так как ремоделирование легочной ткани является характерным процессом для обоих заболеваний.

Работа выполнена при поддержке гранта Президента РФ молодым ученым (МД-3312.2014.7).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Cui Y. et al. Mol Med. 2014 Feb 3. doi: 10.2119/mol-med.2013.00123. [Epub ahead of print]
2. Hamada N., Kuwano K., Yamada M. Et al. J. Immunol. 2005;14:1224-1231.
3. Ferrara N., Gerber H.P., LeCouter J. Nat Med. 2003;14:669-676. doi: 10.1038/nm0603-669.
4. Ferguson H. E., Kulkarni A., Lehmann G.M. et al. Am J Respir Cell Mol Biol. 2009 December; 41 (6): 722-730.
5. Kolb M., Bonniaud P., Galt T. et al. J. Am J Respir Cell Mol Biol 2002;27:141-150.

### ENDOTHELIAL MODEL OF IDIOPATHIC PULMONARY FIBROSIS IN BULLOUS LUNGS DISEASE

Pustovetova M. G., Chikinev Y. V., Piontkovskaya K. A.,  
Drobayzgin E. A., Samsonova E. N.

*Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russia*

The article assesses the model of idiopathic pulmonary fibrosis, main element of which is the imbalance of cellular trigger factor of angiogenesis by cytokines. Current research compares mechanisms of bullous lung disease development with novel mechanism of lung fibrosis development, considering the approach of bullous disease surgical correction.

## ИССЛЕДОВАНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ Т-РЕГУЛЯТОРНЫХ ЛИМФОЦИТОВ В БРЫЖЕЕЧНЫХ ЛИМФАТИЧЕСКИХ УЗЛАХ У ПОТОМКОВ КРЫС С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ ГЕСТАЦИОННЫМ ДИАБЕТОМ

Прозорова Т. М., Камышный А. М.

*Запорожский государственный медицинский университет,  
Запорожье, Украина*

С помощью иммунофлуоресцентного метода исследовали влияние гестационного диабета на состав лимфоцитов брыжеечных лимфатических узлов крыс линии Wistar. Оценивали распределение Т-регуляторных клеток, экспрессирующих транскрипционный фактор Foxp3. Выявлено достоверное снижение количества регуляторных Foxp3<sup>+</sup>-лимфоцитов у потомства крыс с экспериментальным гестационным диабетом, а также снижение концентрации транскрипционного фактора Foxp3 в лимфоцитах коркового плато. Выявленные изменения иммунологического пейзажа позволяют предположить риск развития сахарного диабета у потомков от матерей с ЭГД.

*Ключевые слова:* экспериментальный гестационный диабет, брыжеечные лимфатические узлы, Treg.

**Актуальность и цель работы.** На данный момент возрастает интерес к исследованию гестационного диабета (ГД), последствий, которые могут возникнуть у потомков, рожденных от матерей с ГД, и возможности их коррекции. Известно, что на ранних сроках ГД приводит к возникновению пороков развития, а на поздних – к макросомии, гиперинсулинемии и диабетической фетопатии плода [1]. Интранатальная гипергликемия, которая развивается при ГД, может влиять на морфогенез органов иммунной системы, что, в свою очередь, может приводить к нарушениям формирования иммунологической толерантности к панкреатическим антигенам и развитию сахарного диабета 1 типа у потомков. Среди возможных методов специфической профилактики СД1 одним из перспективных путей представляется формирование оральной толерантности (ОТ) к инсулину, как основному β-клеточному антигену [2]. Ключевым местом для индукции ОТ являются брыжеечные лимфатические узлы (БЛУ), в которых происходит интенсивная активация наивных Т-хелперов и их дифференцировка в субпопуляции эффекторных клеток [3, 4]. Одним из важнейших факторов

образования регуляторных лимфоцитов (Treg) является транскрипционный фактор Foxp3. Нехватка лимфоцитов этого класса приводит к дефициту супрессорной сигнализации и возникновению различных аутоиммунных заболеваний, в том числе и СД1.

**Целью** нашей работы является изучение особенностей экспрессии Foxp3 в брыжеечных лимфатических узлах у потомков крыс с экспериментальным гестационным диабетом (ЭГД).

**Материалы и методы.** Исследования проведены на 1- и 6-месячных самцах – потомках крыс с ЭГД. Для изучения влияния пренатально воздействующей хронической гипергликемии на плод нами была разработана модель экспериментального гестационного диабета (ЭГД) у самок крыс линии Вистар. ЭГД моделировали однократным введением стрептозотоцина в дозе 45 мг/кг веса животного на 14-15 сутки датированной беременности крысы, что соответствует последнему триместру беременности. После индукции диабета самок выпаивали в первый день 20% р-ром глюкозы, на второй день – 10% р-ром глюкозы для снижения риска развития острой ги-

погликемии, которая развивается вследствие значительной одномоментной деструкции  $\beta$ -клеток и повышения концентрации инсулина в крови. Потомки крыс с ЭГД находились на высококалорийном рационе со свободным доступом к воде и пище. Структуру классов Foxp3<sup>+</sup>-клеток изучали путем анализа серийных гистологических срезов, обработанных МКАТ к транскрипционному фактору Foxp3 (Santa Cruz Biotechnology, США). Обработанные гистологические срезы изучали с помощью компьютерной программы ImageJ (NIH, США). Изображение, получаемое на микроскопе Primo Star (ZEISS, Германия) в ультрафиолетовом спектре возбуждения 390 нм (FITC) с помощью высокочувствительной камеры Axio Cam 5c (ZEISS, Германия) и пакета программ для получения, архивирования и подготовки изображений к публикации Axio Vision 4.7.2 (ZEISS, Германия) немедленно вводили в компьютер. При этом в автоматическом режиме определялись области со статистически значимой флуоресценцией, характерной для лимфоидных клеток экспрессирующих Foxp3. Вычислялись морфометрические и денситометрические характеристики иммунопозитивных клеток. При окраске антителами исследовали иммунопозитивные лимфоциты, расположенные в корковом плато и мякотных тяжах БЛУ.

**Результаты.** Изучение серийных срезов брыжеечных лимфатических узлов показало следующие результаты: в контрольной группе 1-месячных потомков интактных животных суммарная плотность Foxp3<sup>+</sup>-лимфоцитов составила  $44 \pm 4$  в корковом плато, и  $50 \pm 3$  на  $1 \text{ мм}^2$  в мозговых тяжах, к возрасту 6 месяцев несколько уменьшалась до  $39 \pm 3$  и  $42 \pm 3$  на  $1 \text{ мм}^2$  соответственно. Анализ суммарной плотности популяции Foxp3<sup>+</sup>-лимфоцитов в экспериментальных группах животных показал: у 1-месячных потомков крыс с ЭГД обнаружилось сниженное на 57% ( $p < 0.05$ ) количество Т-регуляторных клеток в корковом плато и на 76% ( $p < 0.05$ ) в мозговых тяжах. У 6-месячных крыс эти показатели были снижены на 54% ( $p < 0.05$ ) и на 64% ( $p < 0.05$ ) соответственно.

Изучение распределения отдельных классов Treg показало, что количество Foxp3<sup>+</sup>-лимфобластов относительно контрольных групп уменьшилось в наибольшей мере: в 1-месячном возрасте на 78% ( $p < 0.05$ ) в корковом плато и на 92% ( $p < 0.05$ ) в мозговых тяжах БЛУ,

а у 6-месячного потомства на 33% ( $p < 0.05$ ) и на 78% ( $p < 0.05$ ) соответственно. Количество Foxp3<sup>+</sup>-малых и средних лимфоцитов у потомства крыс с ЭГД снижалось в меньшей мере, при этом в структуре популяции Treg процент Foxp3<sup>+</sup>-средних лимфоцитов оставался прежним, достоверно уменьшалась процентная доля Foxp3<sup>+</sup>-лимфобластов и увеличивалось процентное число Foxp3<sup>+</sup>-малых лимфоцитов.

Измерение интенсивности флуоресценции, которая отражает концентрацию транскрипционного фактора Foxp3 в иммунопозитивных клетках, показало достоверное снижение флуоресценции в корковом плато БЛУ во всех классах Foxp3<sup>+</sup>-клеток у 1-месячного потомства, и выравнивание этого показателя к 6-месячному возрасту. В мозговых тяжах наблюдалось достоверное увеличение интенсивности флуоресценции у Foxp3<sup>+</sup>-малых лимфоцитов обеих возрастных групп.

Известно, что ГД приводит к изменению субпопуляционного состава лимфоцитов в крови, однако данных об изменениях уровня Treg в органах иммунной системы у потомства практически нет. Так, у новорожденных от матерей с ГД в пуповинной крови был выше уровень CD8-лимфоцитов с Т-клеточным рецептором гамма/дельта и ниже CD16-клеток, чем у детей группы контроля. Характерно, что количественный уровень Treg в крови, а также провоспалительных цитокинов IL-1 $\beta$  и ФНО $\alpha$  был повышен, однако супрессорная активность регуляторных клеток – снижена [5].

Таким образом, можно сделать вывод о снижении количества регуляторных Foxp3<sup>+</sup>-лимфоцитов в БЛУ у потомства крыс с ЭГД, а также о снижении концентрации транскрипционного фактора Foxp3 в лимфоцитах коркового плато. Выявленные изменения иммунологического пейзажа могут свидетельствовать о риске развития сахарного диабета у потомков от матерей с ЭГД.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Yessoufou A., Moutairou K. *Exp Diabetes Res* 2011, 3, 37-46.
2. Weigmann B., Franke R., Daniel C. *Rev Diabet Stud* 2012, 9, 68-81.
3. Macpherson A., Smith K. *J Exp Med* 2006, 203, 497-500.
4. Worbs T. et al. *J Exp Med* 2006, 203, 519-527.
5. Lapolla A. et al. *Cytokine* 2005, 31, 280-7.

## INVESTIGATION THE DISTRIBUTION FEATURES OF TREG SUBSETS IN THE MESENTERIC LYMPHOID NODES IN OFFSPRING OF RATS WITH EXPERIMENTAL GESTATIONAL DIABETES

Prozorova T. M., Kamyshny A. M.

Zaporozhye State Medical University, Zaporozhye, Ukraine

Using immunofluorescence method investigated the effects of gestational diabetes on the composition of lymphocyte mesenteric lymph nodes Wistar rats. We evaluated the distribution of the transcription factor Foxp3. A significant decrease in the number of regulatory Foxp3<sup>+</sup>-lymphocytes in the offspring of rats with experimental gestational diabetes, as well as reduction in the density of the transcription factor Foxp3 in the lymphocytes of cortical plateau were shown. The changes revealed immunological landscape suggest the risk of developing diabetes in the offspring of mothers with experimental gestational diabetes.

*Keywords:* experimental gestational diabetes, mesenteric lymph nodes, Treg.

## КОРРЕЛЯЦИИ МЕЖДУ ОТДЕЛЬНЫМИ ХАРАКТЕРИСТИКАМИ ИММУННОГО И ВЕГЕТАТИВНОГО СТАТУСА, ВЫРАЖЕННОСТИ ВОСПАЛИТЕЛЬНОЙ РЕАКЦИИ И ПОКАЗАТЕЛЯМИ ЛЕЙКОЦИТАРНОГО ИНДЕКСА ИНТОКСИКАЦИИ

Скрябина В. В.

ГБОУ ВПО Пермский государственный медицинский университет  
им. ак. Е. А. Вагнера, Пермь, Россия

У больных с угрожающим выкидышем проведен корреляционный анализ между отдельными показателями, характеризующими состояние иммунной и вегетативной нервной системы, выраженность воспалительной реакции и лейкоцитарным индексом интоксикации (ЛИИ). Показано, что ЛИИ в большей степени коррелирует с особенностями состояния вегетативной нервной и иммунной систем, а не с выраженностью воспалительной реакции. Сделан вывод о том, что показатели ЛИИ являются интегративной количественной характеристикой адаптивных, а не воспалительных реакций.

*Ключевые слова:* лейкоцитарный индекс интоксикации, угрожающий выкидыш, вегетативная нервная система, фагоцитоз, интерлейкин-1.

Простая и доступная интегративная оценка состояния пациента является одной из заманчивых идей для клинициста. В реализации ее были попытки использовать бальные оценочные шкалы, основанные на данных анамнеза [4]; давать характеристику адаптивных реакций на основании анализа «белой» крови [1]; рассчитывать лейкоцитарный индекс интоксикации (ЛИИ) у больных с инфекционно-воспалительными заболеваниями [2]. Учитывая, что генерализованные инфекции вызывают

реакцию со стороны всех систем адаптации, а рассчитать ЛИИ можно у пациенток, не имеющих выраженных воспалительных реакций, интересным было проанализировать корреляции между ЛИИ и отдельными показателями, характеризующими состояние иммунной и вегетативной нервной систем (ВНС) у лиц без тяжелых инфекционно-воспалительных заболеваний. В качестве модели были выбраны беременные с угрожающим выкидышем (УВ) в I триместре.

**Цель исследования.** Изучить корреляции между ЛИИ и отдельными характеристиками иммунного и вегетативного статуса у беременных с УВ в I триместре.

**Материалы и методы.** Проведен корреляционный анализ между показателями, полученными при обследовании 36 больных с УВ в I триместре до начала лечения. Анализировали степень связи между ЛИИ и наличием клинических и лабораторных признаков вульвовагинита и бактериурии; выявленными возбудителями урогенитального воспалительного процесса; титрами антител к вирусным инфекциям; показателям фагоцитарного индекса (ФИ), фагоцитарного числа (ФЧ) и процентом фагоцитоза (ФЦ); интерлейкином-1 (ИЛ-1); показателями вариационной пульсометрии – индексом напряжения (ИН) регуляторных систем и реактивностью ВНС, которую оценивали по соотношению ИН в ортопробе (ИН2) к ИН в покое (ИН1) – ИН2/ИН1 [3]; данными спектрального анализа variability сердечного ритма (ВСР) – совокупностью всех влияний на сердечный ритм (общей мощностью спектра – Total) и его составляющими – процентным вкладом влияний, модулирующих сердечный ритм (колебаниями с частотой 0,15–0,40 Гц и более – быстрыми дыхательными волнами – high frequency –% HF, происхождение которых связывают с парасимпатической активностью; колебаниями с частотой от 0,04 до 0,15 Гц – низкочастотными – low frequency –% LF, обусловленными симпатической активностью ВНС; колебаниями с частотой менее 0,04 Гц – очень медленными низкочастотными волнами – very low frequency –% VLF, обусловленными гуморально-метаболическими влияниями и связанными с активностью циркулирующих гормонов в крови и активностью метаболических процессов в тканях).

ЛИИ рассчитывали на основании общего анализа крови, сданного в первом триместре, по методике Кальф-Калифа [2] в условных единицах (усл.ед.):

$$\text{ЛИИ} = ((4 \text{ миелоциты}^* + 3 \text{ юные} + 2 \text{ палочкоядерные} + \text{ сегментоядерные}) \times (\text{пл.кл.}^{**} + 1)) / ((\text{лимфоциты} + \text{моноциты}) \times (\text{эозинофилы} + 1))$$

\* – все показатели приводятся в процентах;

\*\* – плазматические клетки.

Количественные показатели представлены как М (среднее значение)  $\pm$  SD (стандартное отклонение). Степень связи оценивали с по-

мощью рангового коэффициента корреляции Спирмена (r). Слабой считали связь, если значение показателя силы связи было меньше 0,25; умеренной – при  $0,25 \leq r < 0,75$ ; сильной  $\geq 0,75$ ; статистически значимыми считали значения  $p < 0,05$ .

**Полученные результаты.** Из 36 беременных клинические проявления урогенитальных инфекционно-воспалительных процессов имели 23 человека (63,89%); возбудителей воспалительного процесса (хламидии; микоплазмы; условнопатогенную микрофлору в диагностически значимых титрах) в моче и секрете цервикального канала – 31 человек (86,11%). Антитела (IgG) к цитомегаловирусу (ЦМВ), вирусу простого герпеса (ВПГ) и краснухе были у всех обследованных. Титры антител к ЦМВ составили  $19,64 \pm 8,08$  МЕд/мл, к ВПГ – 1:  $110,77 \pm 22,87$ , к краснухе –  $82,99 \pm 35,86$  МЕд/мл. Индексы avidности (ИА) антител к ЦМВ –  $86,43 \pm 9,61\%$ , к ВПГ –  $99,46 \pm 9,69\%$ , к краснухе –  $82,70 \pm 12,76\%$ . Показатели ВСР в покое были – ИН  $111,14 \pm 65,66$  усл. ед., Total  $2341,29 \pm 540,14$ , VLF  $33,83 \pm 4,56\%$ , LF  $25,18 \pm 3,31\%$ , HF  $41,02 \pm 5,04\%$ ; LF/HF  $0,83 \pm 0,55$ . В ортопробе – ИН  $140,66 \pm 38,57$  усл. ед., Total  $3581,55 \pm 1200,56$ , VLF  $39,08 \pm 4,32\%$ , LF  $31,05 \pm 4,47\%$ , HF  $30,12 \pm 4,56\%$ ; LF/HF  $1,46 \pm 0,49$ ; ИН2/ИН1  $1,94 \pm 0,85$ . Показатели ФЦ составили  $74,00 \pm 2,86\%$ ; ФИ –  $2,48 \pm 0,31$ ; ФЧ –  $2,19 \pm 0,57$ ; уровень ИЛ1 –  $2,73 \pm 0,97$  пг/мл, ЛИИ –  $1,41 \pm 0,46$  усл. ед.

Проведение корреляционного анализа выявило сильную связь между ЛИИ и ИН в ортопробе ( $r = +0,80$ ;  $p = 0,001$ ). Средней силы – с% VLF в покое ( $r = +0,59$ ;  $p = 0,02$ ), с реактивностью вегетативной нервной системы – ИН2/ИН1 ( $r = +0,57$ ;  $p = 0,04$ ), с% HF ( $r = -0,52$ ;  $p = 0,03$ ), с Total в покое ( $r = -0,44$ ;  $p = 0,05$ ) и ортопробе ( $r = -0,52$ ;  $p = 0,04$ ), с ИА антител к ВПГ ( $r = +0,58$ ;  $p = 0,05$ ) и ФИ ( $r = +0,36$ ;  $p = 0,01$ ). Слабую – с титром антител к ВПГ ( $r = -0,23$ ;  $p = 0,05$ ) и к краснухе ( $r = +0,20$ ;  $p = 0,04$ ), с ИА антител к краснухе ( $r = +0,20$ ;  $p = 0,02$ ) и ЦМВ ( $r = -0,19$ ;  $p = 0,02$ ), с клиническими симптомами урогенитального инфекционно-воспалительного процесса ( $r = +0,16$ ;  $p = 0,05$ ), ИЛ1 ( $r = +0,15$ ;  $p = 0,04$ ), титрами антител к ЦМВ ( $r = -0,04$ ;  $p = 0,04$ ), идентифицированными бактериальными возбудителями воспалительного процесса ( $r = -0,04$ ;  $p = 0,04$ ).

Т. о., оказалось, что у больных с УВ в I триместре ЛИИ в большей степени коррелирует

с особенностями состояния ВНС – увеличение ЛИИ отражает высокую реактивность ВНС при физической нагрузке, обеспечиваемую симпатoadренальным звеном; в покое – выраженную активность гуморально-метаболических процессов. Кроме того, этот показатель отражает эффективность противовирусной защиты и фагоцитоза, но практически не связан с маркерами выраженности воспалительной реакции, клиническими симптомами и идентифицированными бактериальными возбудителями. Поэтому, увеличение ЛИИ отражает не столько активность самого воспалительного процесса, сколько состояние адаптивных систем при действии любого возмущающего фактора, в т.ч. и инфекционного агента, а сам показатель является не маркером выраженности воспалительной реакции, а интегративным показателем, характеризующим особенности адаптивной реакции. Выявленные корреляционные связи дают основания для проведения дальнейших исследований по поводу целесообразности использования ЛИИ – доступного в каждом лечебном учреждении показателя – в клинической практике, в том числе и у беременных, в качестве скринингового теста для выявления лиц с иммунодефицитными состояниями и оценки особенностей адаптивных реакций.

#### **Выводы:**

1. У больных с УВ ЛИИ в большей степени отражает особенности состояния вегетатив-

ной и иммунной систем при на действии инфекционного агента, следовательно, является интегративной характеристикой в первую очередь адаптивных, а не воспалительных, реакций.

2. Высокие показатели ЛИИ соответствуют хорошей реактивности ВНС, высокой тонусу симпатoadренального звена, активным гуморально-метаболическим процессам в покое, способности к продукции высокоавидных антител, эффективному фагоцитозу; низкие – низкой реактивности ВНС, значительным парасимпатическим влиянием, не высокой эффективности противовирусной защиты и фагоцитоза.

#### **СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Гаркави, Л.Х. Адаптационные реакции и резистентность организма, 3-е издание дополненное / Л.Х. Гаркави, Е.Б. Квакина, М.А. Уколова. – Ростов-на-Дону, 1990. – 224 с.
2. Кальф-Калиф, Я.Я. О лейкоцитарном индексе интоксикации и его практическом значении / Я.Я. Кальф-Калиф // Врачебное дело. – 1941. – № 1. – С. 31-35.
3. Белоконов, Н.А. Болезни сердца и сосудов у детей: Руководство для врачей: В 2 томах, Т. 1. / Н.А. Белоконов, М.Б. Кубергер. – М.: Медицина, 1987. – 448 с.: ил.
4. Радзинский В.Е. Акушерская агрессия. М.: Медиабюро Статус презенс / В.Е. Радзинский. – 2011. – 688 с.

### **CORRELATION BETWEEN CHARACTERISTICS OF IMMUNE AND VEGETATIVE STATUS, SEVERITY OF THE INFLAMMATORY RESPONSE AND LEUKOCYTE INDEX OF INTOXICATION**

**Skryabina V. V.**

*Perm State Medical University, Perm, Russia*

In patients with a threatening miscarriage a correlation analysis between individual indicators State of the immune and vegetative nervous systems, the severity of the inflammatory reaction and leukocytary index of intoxication (LII). Shows that LII is more correlated with the features of the autonomic nervous and immune systems, but not with the magnitude of the inflammatory response. Concludes that the characteristics of LII are integrative characteristics of LII are integrative quantitative characteristic of adaptive, not inflammatory, reactions.

## МОДЕЛИРОВАНИЕ И ПРОГНОЗИРОВАНИЕ ФОРМИРОВАНИЯ ПЕРВИЧНОЙ ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ ГЕМОБЛАСТОЗАМИ У ВЗРОСЛОГО НАСЕЛЕНИЯ

Смолягин А. И.<sup>1</sup>, Лебедеко С. А.<sup>2</sup>, Ермолина Е. В.<sup>1</sup>,  
Чепасов В. И.<sup>3</sup>, Боев В. М.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ГБОУ ВПО «Оренбургский государственный медицинский университет»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации; <sup>2</sup>ГБУЗ «Оренбургская  
областная клиническая больница»; <sup>3</sup>ГБОУ ВПО «Оренбургский государственный  
университет» Министерства образования Российской Федерации,  
Оренбург, Россия

В работе представлены данные корреляционного и факторного анализа между уровнем антропогенной нагрузки и показателями первичной заболеваемости гемобластозами у взрослых жителей различных регионов Оренбургской области. Определен вклад различных факторов окружающей среды в формировании данной патологии. Разработаны модели прогнозирования первичной заболеваемости гемобластозами в зависимости от уровня антропогенной нагрузки.

*Ключевые слова:* гемобластозы, антропогенная нагрузка, прогнозирование.

Известно, что гигиенические условия жизни в большинстве регионов Российской Федерации характеризуются высоким уровнем загрязнения атмосферного воздуха, питьевой воды, почвы, продуктов питания. Оренбургская область – агропромышленный регион, ведущими ветвями экономики которого являются: топливная промышленность, черная и цветная металлургия, химическая, нефтехимическая и пищевая отрасли. На территории Оренбургской области находится крупнейшее в России Оренбургское газоконденсатное месторождение, ведется добыча нефти, железных, медных и никелевых руд, асбеста. Многие предприятия размещены непосредственно на территории городов, что оказывает существенное негативное воздействие на состояние окружающей среды городов области. Факторы окружающей среды могут иметь многообразные прямые или опосредованные связи с нарушением здоровья населения. Редко они выступают в результате первопричины тех или иных нарушений в состоянии здоровья человека, значительно чаще заболевания возникают при воздействии множества слабых причинных факторов, обладающих модифицирующим действием [4]. Несомненно, за-

грязнение атмосферы, воды и почвы в местах проживания увеличивает риск развития злокачественных новообразований и, в том числе, заболеваний крови. В ранее проведенных исследованиях установлено, что высокие среднегодовалые показатели суммарного химического загрязнения атмосферного воздуха, питьевой воды и почвы пришлись на территории Оренбургской области, где сосредоточены предприятия тяжелой и химической промышленности [1]. В целом, из всех городов и районов Оренбургской области большинство высоких показателей первичной заболеваемости гемобластозами наблюдались на урбанизированных территориях [2, 3]. Целью работы явилось определение долевого вклада отдельных факторов риска здоровью с моделированием и прогнозированием первичной заболеваемости гемобластозами у взрослого населения проживающего на территории Оренбургской области.

На первом этапе работы был проведен корреляционный анализ между уровнем антропогенной нагрузки в виде суммарного химического загрязнения атмосферного воздуха ( $K_{\text{атм.}}$ ), питьевой воды ( $K_{\text{воды}}$ ) и почвы ( $K_{\text{почвы}}$ ) и показателями первичной заболеваемости

гемобластозами и их группами, объединенных по степени зрелости опухолевых клеток или линии гистогенеза в различных регионах Оренбургской области. На основании оценки совокупности сильных корреляционных парных связей суммарного химического загрязнения окружающих сред и уровня первичной заболеваемости гемобластозами в Оренбургской области (при  $r > 0,7$ ) долевой вклад суммарного химического загрязнения воздуха ( $K_{\text{атм}}$ ) в формирование первичной заболеваемости опухолями крови составил 33,3%, суммарного химического загрязнения питьевой воды ( $K_{\text{воды}}$ ) – 44,4% и почвы ( $K_{\text{почвы}}$ ) – 22,3%. Значения коэффициентов корреляции с наиболее сильной прямой силой связи ( $r > 0,9$ ) установлены между  $K_{\text{атм}}$  и уровнем первичной заболеваемости острыми лейкозами и лимфо-пролиферативными заболеваниями в районах области, где расположены предприятия черной и цветной металлургии. Сильная прямая корреляционная связь отмечена и в группе лимфо-пролиферативных заболеваний с  $K_{\text{воды}}$  и  $K_{\text{почвы}}$  в отдельных сельских районах, с высоким уровнем химического загрязнения окружающей среды.

По данным факторного анализа установлено, что все показатели суммарного химического загрязнения окружающей среды ( $K_{\text{атм}}$ ,  $K_{\text{воды}}$ ,  $K_{\text{почвы}}$ ) и различные группы гемобластозов, объединенных по степени зрелости опухолевых клеток и линии гистогенеза распределяются по трем факторам, которые составляют 77,8% обобщенной дисперсии. Первый фактор (28,0%), который можно назвать «фактором атмосферного воздуха» включает 20 показателей лимфо-пролиферативных заболеваний, 10 показателей миело-пролиферативных заболеваний и 11 показателей группы острых лейкозов во всех зонах Оренбургской области. Второй фактор (26,6%), который можно назвать «фактором питьевой воды» включает 22 показателя лимфо-пролиферативных заболеваний, 11 показателей миело-пролиферативных заболеваний и 6 показателей группы острых лейкозов. Третий фактор (23,2%) – «фактор почвы», включает 14 показателей лимфо-пролиферативных заболеваний, 11 показателей миело-пролиферативных заболеваний и 9 показателей группы острых лейкозов. При совокупной оценке данных корреляцион-

ного и факторного анализов, большая часть показателей первичной заболеваемости гемобластозами имеет связь с  $K_{\text{атм}}$ .

Учитывая результаты корреляционного и факторного анализов, были разработаны модели прогнозирования первичной заболеваемости гемобластозами у взрослого населения Оренбургской области в зависимости от уровня антропогенной нагрузки. Для оценки тенденций в уровне первичной заболеваемости гемобластозами и его прогнозирования использовались модели, построенные методом наименьших квадратов. По этим моделям определялись оценки влияния на зависимый параметр параметров – аргументов. В качестве параметра – аргумента использовались известные значения суммарного химического загрязнения сред окружающей среды (атмосферный воздух, питьевая вода, почва). При проведении параметрического анализа, в качестве зависимого параметра рассматривался уровень первичной заболеваемости.

При проведении анализа с использованием математических моделей было установлено, что точность прогнозирования развития гемобластозов, в зависимости от уровня антропогенной нагрузки, и общая прогностическая возможность модели приближается к 100%. На основании прогнозных значений предполагается, что при сохранении прежнего уровня суммарного химического загрязнения окружающей среды продолжится рост уровня первичной заболеваемости гемобластозами как в городах, так и сельских районах, с преимущественным увеличением доли новообразований крови на наиболее урбанизированных территориях.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Боев В. М., Куксанов В. Ф., Быстрых В. В. Химические канцерогены среды обитания и злокачественные новообразования. Медицина, Москва 2002, 343.
2. Боев М. В., Колесников Б. Л., Сетко А. Г. Здоровье населения и среда обитания Оренбургской области. Димур, Оренбург 2013, 328.
3. Лебеденко С. А., Боев В. М., Кузнецова Е. Е., Кучма Г. Б. Российский аллергологический журнал 2013, 2, 49-50.
4. Knox E. G. J. Epidemiol Community Health 2005, 59 (2), 101-105.



## MODELING AND FORECASTING OF FORMATION OF THE PRIMARY DISEASE IN ADULTS WITH HEMATOLOGICAL MALIGNANCIES

Smolyagin A.I.<sup>1</sup>, Lebedenko S.A.<sup>2</sup>, Ermolina E.V.<sup>1</sup>,  
Chepasov V.I.<sup>3</sup>, Boev V.M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Orenburg State Medical University; <sup>2</sup>Orenburg Regional Hospital;

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

The work presents the data correlation and factor analysis between the level of anthropogenic pressures and rates of primary morbidity in adults with hematological malignancies of different regions of the Orenburg region. Determined the contribution of different environmental factors in the formation of this pathology. Developed models predicting primary morbidity of hematological malignancies depending on the level of anthropogenic load.

*Keywords:* hematological malignancies, anthropogenic pressures, prediction.

---

---

## ОСОБЕННОСТИ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНОЙ АКТИВНОСТИ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ БОЛЬНЫХ МЕХАНИЧЕСКОЙ ЖЕЛТУХОЙ ДОБРОКАЧЕСТВЕННОГО ГЕНЕЗА

Смирнова О. В.<sup>1,2</sup>, Титова Н. М.<sup>2</sup>, Елманова Н. Г.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБНУ «Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера»;

<sup>2</sup>Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Сибирский федеральный университет»,  
Красноярск, Россия

Авторами изучены особенности хемилюминесцентной активности нейтрофильных гранулоцитов у больных механической желтухой доброкачественного генеза в зависимости от уровня билирубина. Объектом исследования явились 100 практически здоровых людей и 38 больных механической желтухой, разделенные на три группы в зависимости от уровня билирубина. Оценка спонтанной и индуцированной хемилюминесценции нейтрофильных гранулоцитов осуществлялась по методу De sole et al, 1983. У больных механической желтухой доброкачественного генеза наблюдается увеличение активности нейтрофильных гранулоцитов, в зависимости от уровня билирубина в крови. Наибольшие изменения функций нейтрофильных гранулоцитов регистрируются у больных механической желтухой с уровнем билирубина более 200 мкмоль/л при индуцированной хемилюминесценции. Нарушение баланса между спонтанной и индуцированной суммарной продукцией активных форм кислорода выявлено у больных с уровнем билирубина 60-200 мкмоль/л, что свидетельствует о кумулятивном эффекте билирубина не только на гепатоциты, но и на клетки крови. При уровне билирубина более 200 мкмоль/л развивается токсический эффект на все клетки и ткани организма, что вероятно, и обуславливает неблагоприятный исход заболевания.

*Ключевые слова:* механическая желтуха, иммунитет, нейтрофильные гранулоциты.

Механическая желтуха (МЖ) – это тяжелое патологическое состояние организма, вызванная обструкцией желчевыводящего протока, и требующее немедленного оперативного посо-

бия больному. Наиболее подвержены синдрому МЖ женщины в возрасте старше 30 лет [4]. Этиологически механическая желтуха может быть доброкачественного (60–80%) и опухоле-

вого генеза (20–40%) [5]. Наиболее частой причиной МЖ доброкачественного генеза является желчекаменная болезнь, которая по оценкам разных авторов диагностируется до 10% взрослого населения развитых стран.

Прогрессирование механической желтухи зависит от уровня билирубина, при концентрации билирубина в крови выше 200 мкмоль/л у всех больных развивается клеточно-печеночная недостаточность, с неблагоприятным исходом [1]. Одним из патогенных механизмов возникновения и прогрессирования механической желтухи является воспаление и наличие инфекционного бактериального агента. Неспецифические факторы иммунного ответа макроорганизма направлены на элиминацию последнего. Таким образом, прогрессирование механической желтухи зависит не только от уровня билирубина в крови, но и от функциональной активности неспецифических фагоцитов.

В связи с этим, целью нашей работы было изучить особенности спонтанной и индуцированной хемилюминесцентной (ХЛ) активности нейтрофильных гранулоцитов (НГ) у больных МЖ доброкачественного генеза в зависимости от уровня билирубина в крови.

**Материалы и методы исследования.** Объектом исследования были 38 больных МЖ, в возрасте от 42 до 65 лет ( $53,5 \pm 3,7$ ), поступившие в первое хирургическое отделение КГБУЗ «Красноярской межрайонной клинической больницы скорой медицинской помощи имени Н. С. Карповича» г. Красноярск в 2013 году с диагнозом механическая желтуха доброкачественного генеза. Контрольную группу составили 100 здоровых добровольцев, сопоставимых по полу и возрасту с основной группой. Обследование больных и практически здоровых людей проводилось с разрешения этического комитета ФГБНУ «НИИ МПС», при этом каждый участник подписывал форму информированного согласия на обследование. Оценка неспецифического звена иммунитета проводилась при поступлении больных в стационар до патогенетической терапии. Материалом исследования была венозная кровь, которая забиралась при поступлении больного.

Оценка спонтанной и индуцированной хемилюминесценции НГ осуществлялась в течение 90 минут на 36-канальном хемилюминесцентном анализаторе «CL3604» (Россия) (метод de sole et al, 1983). Определяли время

выхода на максимум свечения ( $T_{max}$ ), максимальное значение свечения ( $I_{max}$ ) и площадь под кривой свечения ( $S$ ), характеризующее суммарную продукцию активных форм кислорода. Дополнительно рассчитывался индекс активации, в виде  $S_{инд}/S_{спонт}$ . Для усиления хемилюминесценции использовался люминол, а в качестве индуктора дыхательного «взрыва» – зимозан. [2, 3, 5]

Статистическая обработка данных проводилась с помощью Statistica 7.0 (StatSoft, USA). Анализ соответствия вида распределения признака закону нормального распределения проводился с использованием критерия Шапиро-Уилка. Для непараметрических данных вычисляли медиану ( $Me$ ) и интерквартильный размах ( $C_{25}-C_{75}$ ). Достоверность различий ( $p < 0,05$ ) между показателями независимых выборок оценивали по критерию Манна-Уитни.

**Результаты исследования и их обсуждения.** В исследование были включены 100 практически здоровых людей и 38 больных МЖ – 3 человека с уровнем билирубина в крови менее 60 мкмоль/л (2-я группа), 14 человек с уровнем билирубина 60-200 мкмоль/л (3-я группа) и 21 человек с уровнем билирубина более 200 мкмоль/л (4-я группа).

У больных МЖ 2 группы спонтанная интенсивность свечения увеличивалась больше в 6 раз, а в 3 группе в 1,8 раз по сравнению с практически здоровыми людьми ( $p < 0,05$ ). Площадь под кривой спонтанной ХЛ НГ была увеличена в 4 группе в 10 раз, в 3 группе в 9 раз, во 2 группе в 6 раз по сравнению с практически здоровыми людьми ( $p < 0,05$ ).

У больных 2 группы индуцированное время выхода на максимум свечения увеличилось в 2 раза по сравнению с контрольной группой, и снижалось у больных 3 и 4 групп относительно 2 группы. ( $p < 0,05$ ). Индуцированная интенсивность ХЛ НГ была повышена у больных 3 и 4 групп по сравнению с 2 группой ( $p < 0,05$ ). У больных 4, 3 и 2 групп выявлялось увеличение индуцированной площади под кривой ХЛ по сравнению с контрольной группой ( $p < 0,05$ ).

В группе больных с уровнем билирубина в крови менее 60 мкмоль/л наблюдалось увеличение спонтанной интенсивности ХЛ, индуцированного времени выхода на максимум и спонтанного и индуцированного площадей под кривой ХЛ по сравнению с контрольной группой.

У больных МЖ с уровнем билирубина 60-200 мкмоль/л было выявлено увеличение площадей под кривой спонтанной и индуцированной ХЛ по сравнению с практически здоровыми людьми, увеличение индуцированной интенсивности и снижение спонтанной интенсивности ХЛ и индуцированного времени выхода на максимум по сравнению с 2 группой.

У больных МЖ с уровнем билирубина более 200 мкмоль/л увеличены площади под кривой спонтанной и индуцированной ХЛ, и индуцированной интенсивности свечения по сравнению с контрольной группой, увеличена индуцированная интенсивность и уменьшена спонтанная интенсивность и индуцированное время выхода на максимум по сравнению с 2 группой.

**Заключение.** У больных механической желтухой доброкачественного генеза наблюдается увеличение активности нейтрофильных гранулоцитов, в зависимости от уровня билирубина в крови. Наибольшие изменения функций нейтрофильных гранулоцитов регистрируются у больных механической желтухой с уровнем билирубина более 200 мкмоль/л при индуцированной хемилюминесценции. Нарушение

баланса между спонтанной и индуцированной суммарной продукцией активных форм кислорода выявлено у больных с уровнем билирубина 60-200 мкмоль/л, что свидетельствует о кумулятивном эффекте билирубина не только на гепатоциты, но и на клетки крови. При уровне билирубина более 200 мкмоль/л развивается токсический эффект на все клетки и ткани организма, что вероятно, и обуславливает неблагоприятный исход заболевания.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гальперин Э.И. Классификация тяжести механической желтухи // *Анналы хирургической патологии.* – 2012. – Т 17, № 2. – С. 26-33.
2. Смирнова О.В // *Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра СО РАМН.* – 2012. – № 3–2. – С. 185-189.
3. Смирнова О.В., Манчук В.Т., Савченко А.А. // *Медицинская иммунология.* – 2008. – Т. 10, № 6. – С. 543-550.
4. Beckingham, IJ; Ryder, SD ().// *BMJ (Clinical research ed.)* 2001. – 322 (7277). – P. 33–6.
5. Smirnova O. V., Manchouk V. T., Savchenko A. A. // *Indian Journal of Medical Research.* – 2011. – V. 133, № 3. – P. 280-286.

### FEATURES CHEMILUMINESCENT ACTIVITY OF NEUTROPHILIC GRANULOCYTES OF PATIENTS WITH OBSTRUCTIVE JAUNDICE OF BENIGN ORIGIN

Smirnova O. V.<sup>1,2</sup>, Titova N. M.<sup>2</sup>, Elmanova N. G.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Research Institute of Medical Problems of the North Krasnoyarsk;

<sup>2</sup>Siberian Federal University, Krasnoyarsk, Russia

The authors studied the characteristics of the chemiluminescent activity of neutrophilic granulocytes in patients with obstructive jaundice of benign origin depending on the level of bilirubin. The objects of the study were 100 healthy subjects and 38 patients with obstructive jaundice are divided into three groups depending on the level of bilirubin. Assessment of spontaneous and induced chemiluminescence of neutrophils was performed by the method of De sole et al, 1983. In patients with obstructive jaundice of benign origin, an increase depending on the level of bilirubin in the blood levels of neutrophils. The greatest changes in the functions of neutrophils are registered with induced chemiluminescence in patients with obstructive jaundice with bilirubin level more than 200 mmol/l. Imbalance between spontaneous and induced total production of reactive oxygen species was detected in patients with bilirubin 60-200 micromol/L indicating that the cumulative effect of bilirubin not only hepatocytes and blood cells. This develops toxic effect on all cells and tissues of the body at the level of bilirubin more than 200 mmol/l, and that probably causes an unfavorable outcome.

## ПСИХОКОРРЕКЦИОННОЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ ПРИ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЕ И ЕГО ВЛИЯНИЕ НА ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ ПАЦИЕНТОВ

Смык А. В., Маркова Е. В.

*ФГБНУ «НИИ фундаментальной и клинической иммунологии», Новосибирск, Россия*

Известно, что в этиологии и патогенезе бронхиальной астмы большую роль играют психологические факторы, в частности алекситимия. Так как алекситимия характеризуется неспособностью к идентификации и вербализации собственных чувств, можно предположить, что для алекситимичных пациентов традиционные формы психокоррекции будут мало эффективными и нужны принципиально иные подходы, подготавливающие алекситимику к вербальным способам терапевтического взаимодействия. Целью данной работы являлось определение особенностей воздействия методов телесно-ориентированной психокоррекции на психофизиологические и иммунологические параметры пациентов с бронхиальной астмой. Показано, что психокоррекционная работа с пациентами снижает степень выраженности алекситимии, обеспечивает нормализацию некоторых параметров Т-клеточного звена иммунной системы и повышает уровень контроля над заболеванием (согласно «Asthma control test»).

*Ключевые слова:* бронхиальная астма, алекситимия, телесно-ориентированная психокоррекция.

**Введение.** Известно, что бронхиальная астма (БА) – это хроническое воспалительное заболевание дыхательных путей, в котором принимают участие многие клетки и клеточные элементы. Хроническое воспаление обуславливает развитие бронхиальной гиперреактивности, которая приводит к повторяющимся эпизодам свистящих хрипов, одышки, чувства заложенности в груди и кашля, особенно по ночам или ранним утром. Эти эпизоды обычно связаны с распространенной, но изменяющейся по своей выраженности обструкцией дыхательных путей в лёгких, которая часто бывает обратимой либо спонтанно, либо под действием лечения [2]. Кроме того, БА представляет собой классический пример психосоматического заболевания [1], в основе которого лежат как физиологические, так и психологические причины, в том числе, личностные особенности и, в частности, алекситимия [3]. Так как алекситимия характеризуется неспособностью к идентификации и вербализации собственных чувств, можно предположить, что для алекситимичных пациентов традиционные формы психокоррекции будут мало эффективными и нужны принципиально иные подходы, подготавливающие алекситимику к вербальным способам терапевтического взаимодействия. Определённый

терапевтический эффект у данной категории больных может быть достигнут с привлечением невербальных, телесно-ориентированных методов психокоррекции [3, 4, 5].

**Цель исследования:** определение особенностей воздействия методов телесно-ориентированной психокоррекции на психофизиологические и иммунологические параметры пациентов с БА.

**Материалы и методы.** Нами был обследован 141 пациент, в том числе 62 мужчины и 79 женщин, сопоставимых по возрасту, вариантам БА и степени тяжести заболевания. Пациенты были разделены на две группы. С пациентами первой группы проводилась телесно-ориентированная психокоррекция (ТОП) по разработанной нами схеме, направленная на снижение уровня алекситимии. Пациентам второй группы (контрольной) назначалось обследование и медикаментозное лечение по аналогичной схеме, за исключением курса ТОП. Оценка эффективности лечения проводилась в конце стационарного курса (на 18-20 сутки). Клиническая оценка лечения осуществлялась врачом – аллергологом. При обследовании пациентов применялся комплекс экспериментально-психологических (оценка уровня алекситимии; оценка уровня контроля бронхиальной астмы) и иммуноло-

гических методов (определение субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови и фагоцитоза латексных частиц моноцитами и нейтрофилами методом проточной цитофлюорометрии).

**Результаты.** После проведенного лечения, как медикаментозного, так и с присоединением ТОП, все пациенты были выписаны в состоянии клинической ремиссии. Отмечено снижение уровня алекситимии (согласно Торонтской алекситимической шкале) до нормативных показателей. Также после лечения у пациентов группы 1 установлена нормализация сниженных до лечения параметров Т-клеточного звена иммунной системы ( $CD3^+$ ,  $CD4^+$ ). В иммунном статусе пациентов группы 2 достоверных изменений иммунологических параметров не обнаружено. По-нашему мнению, именно уменьшение степени выраженности алекситимии у пациентов группы 1 может быть связано с улучшением показателей Т-клеточного звена иммунной системы, поскольку имеются данные о негативном влиянии алекситимии на содержание  $CD4^+$  клеток [5].

Проведенные нами наблюдения за состоянием пациентов в течение трёх месяцев после выписки из стационара показали, что у пациентов, которым в процессе стационарного лечения был проведен курс телесно-ориентированной терапии и, тем самым, снижен уровень алекситимии, реже наблюдались ночные приступы астмы, они реже пользовались ингалятором с быстродействующим лекарством, по сравнению с больными, которым указанное психокоррекционное воздействие не было проведено. При этом наиболее выраженный эффект телесно-ориентированной психотерапии на указанные показатели зарегистрирован у пациентов мужского пола с доми-

нантным левым полушарием головного мозга; у них же в последующие три месяца, согласно русскоязычной валидизированной версии теста «Asthma control test», был достигнут полный контроль над астмой, что свидетельствует о целесообразности дифференцированного подхода к терапии пациентов, страдающих БА, с учётом индивидуальных особенностей функционирования их нервной системы.

**Заключение.** Таким образом, результаты проведенного исследования свидетельствуют о том, что телесно-ориентированное психокоррекционное воздействие играет существенную роль в восстановительном лечении БА, и повышает эффективность стандартных методов терапии. Вышеизложенное свидетельствует о позитивном влиянии указанного воздействия у больных БА на течение патологического процесса, что является обоснованием включения его в комплексную терапию данного заболевания.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Александр Ф. Психосоматическая медицина. – М.: Институт общегуманитарных исследований, 2009. – 320 с.
2. Глобальная стратегия лечения и профилактики бронхиальной астмы / Под ред. Чучалина А.Г. – М.: Издательский дом «Атмосфера», 2007. – 104 с.
3. Малкина-Пых И.Г. Психосоматика. – М.: Эксмо, 2009. – 1024 с.
4. Сандомирский М.Е. Психосоматика и телесная психотерапия: практическое руководство. – М.: Независимая фирма «Класс», 2007. – 592 с.
5. Смык А.В. Психофизиологические аспекты бронхиальной астмы: подходы к психокоррекции: монография / А.В. Смык, Е.В. Маркова, И.С. Вотчин; Мин-во образования и науки РФ, Новосиб. гос. пед. ун-т, НИИ клинической иммунологии СО РАМН. – Новосибирск: Изд-во НГПУ; 2013. – 86 с.

### PSYCHOCORRECTIONAL EFFECTS IN ASTHMA AND ITS IMPACT ON IMMUNOLOGICAL PARAMETERS OF PATIENTS

Smyk A. V., Markova E. V.

*Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russia*

It is known that psychological factors, in particular alexithymia, play a significant role in the etiology and pathogenesis of asthma. Since alexithymia is characterized by an inability to identify and verbalize their feelings, it can be assumed that for patients with alexithymia traditional forms of psycho-correction will not be very effective and needed a fundamentally different approach for preparing these patients to verbal methods of therapeutic interaction. The aim of this study was to determine the characteristics of the influence of body-oriented psychological correction on physiological and immunological parameters in patients with asthma. It is shown that psychocorrectional work with patients reduces the severity of alexithymia, provides the normalization of some parameters of T-cell immunity and increases the level of control of the disease (according to «Asthma control test»).

## ЦИТОКИН-ИНДУЦИРОВАННАЯ АКТИВАЦИЯ И ПРОЛИФЕРАЦИЯ TCR-AКТИВИРОВАННЫХ Т-ЛИМФОЦИТОВ ПАМЯТИ

Сохоневич Н. А., Юрова К. А., Хазиахматова О. Г.,  
Литвинова Л. С.

Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта, Калининград, Россия

Проведено исследование эффектов цитокинов, имеющих общую  $\gamma$ -цепь рецепторов (rIL-2, rIL-7 и rIL-15), на активацию и пролиферацию TCR-стимулированных Т-клеток иммунной памяти (CD45RO<sup>+</sup>), полученных от здоровых доноров. Выявленная нами *in vitro* относительная резистентность процесса активации и пролиферации TCR-стимулированных CD45RO<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> Т-клеток к эффектам цитокинов, имеющих общую  $\gamma$ -цепь рецепторов (rIL-2, rIL-7 и rIL-15), по сравнению с CD45RO<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитами, может обеспечивать их большую устойчивость к активационному апоптозу, а также создавать необходимые предпосылки для эффективной реализации их цитотоксического потенциала в процессе развития вторичного иммунного ответа.

**Ключевые слова:** Т-клетки памяти, цитокины, маркеры активации, пролиферации (CD69, CD25, CD71).

**Актуальность и цель работы.** Необходимость поиска эффективных способов регуляции иммунологической памяти очевидна. Именно Т-клетки иммунной памяти ответственны за формирование долговременного протективного противоинфекционного и противоопухолевого иммунитета. С другой стороны, Т-клетки памяти, генерированные в результате прерывания иммунологической толерантности к аутоантигенам, играют роль «локомотива» в реализации патогенеза аутоиммунных заболеваний (рассеянный склероз, ревматоидный артрит и др.) и аллергопатологии [1]. Цитокины семейства I типа (IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 и IL-21), имеющие общую  $\gamma$ -цепь, способны оказывать комплексное воздействие на процессы активации, дифференцировки и пролиферации Т-лимфоцитов [2, 3, 4, 5].

**Цель:** оценить влияние цитокинов, имеющих общую  $\gamma$ -цепь рецепторов (IL-2, IL-7, IL-15), на изменение экспрессии поверхностных молекул активации – CD69, CD25 и пролиферации – CD71 в популяции TCR-активированных CD45RO<sup>+</sup> Т-клеток памяти в условиях клеточного культивирования *in vitro*.

**Материалы и методы.** Материалом исследования служила венозная кровь 58 условно здоровых доноров (29 женщин и 29 мужчин, от 20 до 35 лет). Выделенные методом иммуномаг-

нитной сепарации («MiltenyiBiotec», Germany) примированных (CD45RO<sup>+</sup>) Т-лимфоцитов ( $1 \times 10^6$  кл/мл) инкубировали в бессывороточной среде Искова в присутствии Т-клеточного активатора (T-CellActivation/ExpansionKithuman, Ac/Exp) и разных концентраций рекомбинантных форм цитокинов (IL-2, IL-7 и IL-15) (все реагенты MiltenyiBiotec, Германия) в течение 24 и 48 часов при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>.

В эксперименте были использованы следующие варианты культивирования: 1) интактная проба; 2) проба с добавлением Ac/Exp; 3) пробы с добавлением Ac/Exp и rIL-2/rIL-7/rIL-15 ( $0,1 \times 10^{-9}$  г/мл;  $0,5 \times 10^{-9}$  г/мл;  $1,0 \times 10^{-9}$  г/мл). Оценку количества CD45RO<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, экспрессирующих маркеры CD69, CD25 и CD71, проводили методом проточной цитометрии с помощью МКАТ, меченных флуоресцентными метками: ViaBlue, FITC, PE, PE-Cy7, PerCP («eBioscience», США) на приборе «MACSQuantAnalyzer» («MiltenyiBiotec», Германия). Результаты цитометрического анализа были проанализированы с помощью программы «KALUZA Analysis Software» (Beckman Coulter, США). Статистическая обработка результатов осуществлялась с помощью программы IBM SPSS Statistics 20 (Statistical Package for the Social Sciences).

**Результаты.** В интактных CD45RO<sup>+</sup>-культурах, число CD69<sup>+</sup> Т-клеток после оконча-

ния срока инкубации (24 ч) составило 2,51 (0,87–5,3)%. Добавление Т-клеточного активатора увеличивало количество CD45RO<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, в среднем, в 25 раз ( $p < 0,05$ ), изменения равномерно затрагивали CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> субпопуляции.

Инкубация TCR-активированных CD45RO<sup>+</sup> Т-клеток с rIL-2 ( $1,0 \times 10^{-9}$  г/мл) сопровождалась ростом числа CD69<sup>+</sup> Т-клеток за счет хелперной субпопуляции ( $p < 0,05$ ) и не затрагивала цитотоксические Т-клетки. Добавление в среду культивации rIL-15 ( $0,5 \times 10^{-9}$  г/мл) было ассоциировано со снижением количества CD69-позитивных Т-клеток в TCR-активированной CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> субпопуляции, и, напротив, увеличением числа CD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> Т-клеток ( $p \leq 0,05$ ). Обе субпопуляции были нечувствительными к rIL-7.

На момент окончания инкубации (48 ч) содержание CD25<sup>+</sup> Т-лимфоцитов в интактных пробах CD45RO<sup>+</sup> культур было равным – 3,8 (2,88–5,13)%. Добавление Ac/Exp увеличивало число CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD25-позитивных Т-лимфоцитов, в среднем, в 11 раз ( $p < 0,05$ ). Культивирование CD2/CD3/CD28-активированных CD45RO<sup>+</sup> Т-лимфоцитов с добавлением rIL-2 и rIL-7 приводило достоверному повышению числа CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Т-клеток по сравнению с пробой только с добавлением Ac/Exp ( $p \leq 0,05$ ). Цитотоксические и хелперные Т-клетки были чувствительны только к максимальным концентрациям ( $0,5$ ;  $1,0 \times 10^{-9}$  г/мл) rIL-2 и rIL-7.

Интересно, что на фоне TCR-активации *in vitro*, rIL-15 ( $0,5$ ;  $1,0 \times 10^{-9}$  г/мл) обладал угнетающим действием на примированные цитотоксические Т-клетки, достоверно снижая число CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Т-лимфоцитов (по отношению к пробе с активатором) ( $p \leq 0,05$ ). CD45RO<sup>+</sup>

CD4<sup>+</sup>-клетки оказались менее чувствительны к эффектам rIL-15.

Добавление Т-клеточного активатора в культуры примированных (CD45RO<sup>+</sup>) Т-лимфоцитов приводило к двукратному увеличению числа CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD71<sup>+</sup> Т-клеток по сравнению с контролем ( $p \leq 0,05$ ). Действие rIL-2, rIL-15 ( $1,0 \times 10^{-9}$  г/мл) и rIL-7 ( $0,5 \times 10^{-9}$  г/мл) способствовало увеличению числа пролиферирующих CD4<sup>+</sup>CD71<sup>+</sup> Т-клеток ( $p \leq 0,05$ ). TCR-активированные CD45RO<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>-клетки оказались менее чувствительны к эффектам цитокинов.

**Выводы.** В условиях инкубации *in vitro*, TCR-стимуляция примированных Т-клеток памяти способствует активации и пролиферации CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> – субпопуляций. Установлено, что процессы активации и пролиферации цитотоксических CD45RO<sup>+</sup> Т-клеток, ассоциированные с мембранной экспрессией молекул CD69, CD25 и CD71, на фоне TCR-стимуляции, относительно резистентны к действию цитокинов, имеющих общую  $\gamma$ -цепь рецепторов (rIL-2, rIL-7 и rIL-15), по сравнению с CD4<sup>+</sup> Т-клетками.

Работа выполнена в рамках стипендии Президента РФ (СП-454.2013.4) и субсидии на выполнение государственной работы «Организация проведения научных исследований» (№ 603).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Radbruch A., Thiel A. Ann Rheum Dis 2004, 63 (2), 96-101.
2. Rochman Y., Spolski R., Leonard W.J. Nat Rev Immunol 2009, 9 (7), 480-495.
3. Shipkova M., Wieland E. Clin Chim Acta 2012, 413 (9), 1381-1390.
4. Литвинова Л. С., Гуцол А. А., Сохоневич Н. А. и др. Медицинская иммунология 2014, 6 (1), 7–26.
5. Литвинова Л. С., Гуцол А. А., Сохоневич Н. А. и др. Цитология 2013, 55 (8), 566-571.

### CYTOKINE-INDUCED ACTIVATION AND PROLIFERATION OF TCR-ACTIVATED MEMORY T-LYMPHOCYTES

Sokhonevich N. A., Yurova K. A., Khaziakhmatova O. G., Litvinova L. S.

*Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russia*

We investigated the effects of cytokines which have a common receptor  $\gamma$ -chain (rIL-2, rIL-7 and rIL-15) on the activation and proliferation of TCR-stimulated T-memory cells (CD45RO<sup>+</sup>), which were obtained from healthy donors. We have identified *in vitro* the relative resistance of activation and proliferation of TCR-stimulated CD45RO<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-cells to the effects of cytokines, with a common  $\gamma$ -chain receptor (rIL-2, rIL-7 and rIL-15), compared with CD45RO<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-lymphocytes. CD45RO<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-cells are more resistant to activation apoptosis that creates the necessary preconditions for the effective implementation of their cytotoxic potential in the development of the secondary immune response.

## ОСОБЕННОСТИ ИММУННЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ В УСЛОВИЯХ КОНТАМИНАЦИИ ПИТЬЕВОЙ ВОДЫ ТЯЖЕЛЫМИ МЕТАЛЛАМИ

Старкова К. Г.<sup>1</sup>, Безрученко Н. В.<sup>1,2</sup>, Лучникова В. А.<sup>1</sup>,  
Легостаева Т. А.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения»; <sup>2</sup>ФГБОУ ВПО «Пермский государственный национальный исследовательский университет», Пермь, Россия

Проведен анализ особенностей иммунной регуляции у взрослого населения, постоянно проживающего в условиях повышенных концентраций тяжелых металлов в питьевой воде. Установлено снижение фагоцитарной активности, концентрации сывороточных IgG и IgM, повышенные уровни специфических антител к стронцию, изменение продукции интерлейкина-17 и TNF $\alpha$ , а также медиаторов клеток костной системы RANKL и остеопротегерина.

*Ключевые слова:* Иммунная регуляция, специфические антитела, тяжелые металлы.

Определение уровня функциональной активности регуляторных систем поддержания гомеостаза, и в первую очередь иммунной системы, имеет важное значение в связи с выявлением индикаторных показателей адаптационного резерва и устойчивости организма, особенно в условиях постоянно возрастающей техногенной химической нагрузки, а также в связи с необходимостью решения задачи по минимизации ущерба и сохранения здоровья населения [1, 2, 3, 4].

**Цель работы** – исследовать показатели иммунной регуляции у взрослого населения, постоянно проживающего в условиях потребления загрязненной тяжелыми металлами питьевой воды.

**Материалы и методы.** Проведено обследование взрослого населения (36 человек), средний возраст  $35,94 \pm 6,63$ , проживающего на территории эндемичной по избыточному содержанию тяжелых металлов в питьевой воде. Группу контроля составили 38 человек употребляющих питьевую воду с допустимыми значениями санитарно-химических показателей качества. Группы были сопоставимы по возрасту, полу и соматической заболеваемости.

Для определения металлов в биологических средах применяли метод масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой. Фагоцитарную активность выявляли с использованием

в качестве объекта формализированные эритроциты барана. Содержание иммуноглобулинов в сыворотке определяли с помощью иммунодиффузии по Манчини, концентрацию IgE общего, цитокинов интерлейкина-17 и фактора некроза опухолей (TNF $\alpha$ ), маркеров остеометаболизма RANKL (лиганд рецептора активации ядерного фактора каппа-B), остеопротегерина – методом иммуноферментного анализа, специфические антитела к металлам – аллелгосорбентным тестированием.

Статистический анализ полученных данных проводили методом вариационной статистики с расчетом средней арифметической и её стандартной ошибки и *t*-критерия Стьюдента, а также методом корреляционно-регрессионного анализа и расчетом коэффициента детерминации ( $R^2$ ). Различия между группами считали достоверными при  $p < 0,05$ .

В условиях повышенного содержания стронция в источниках питьевого водоснабжения (в среднем на уровне 1,3 ПДК) выявлено присутствие данного элемента в крови обследуемых в концентрации, превосходящей в 4,3 раза аналогичные контрольные значения ( $p < 0,05$ ). Кроме того, отмечена повышенная встречаемость проб с марганцем, свинцом, никелем, мышьяком, превышающих референтные значения и показатели группы сравнения.



Одновременно у взрослого населения исследовали показатели гиперчувствительности. Содержание IgE общего находилось в пределах референтного диапазона и достоверно не отличалось от показателей группы сравнения, однако были существенно повышены уровни специфических антител. Концентрация IgG к стронцию в 36,4% случаев не соответствовала референтному диапазону и составила  $0,163 \pm 0,088$  у.е. при норме  $< 0,10$  ( $p < 0,05$ ).

Также отмечено изменение содержания сывороточных иммуноглобулинов, которое проявилось уменьшением относительно возрастной нормы концентрации IgG и IgM у 47,8% и 82,6% обследованных соответственно ( $p < 0,05$ ). При оценке шансов изменения показателей гуморального иммунитета на фоне возрастания концентрации контаминантов в биосредах показано достоверное понижение уровня IgA при увеличении концентрации марганца, мышьяка в крови ( $R^2 = 0,61 - 0,90$  при  $p < 0,05$ ).

Выявлено угнетение активности фагоцитарной функции иммунной системы, отразившееся в снижении абсолютного количества фагоцитов в 65,2% случаев относительно данных контрольной группы, кратность различий составила в 1,2 раза ( $p < 0,05$ ). Построение математических моделей причинно-следственных связей позволило установить снижение показателей фагоцитоза при возрастании концентрации марганца, мышьяка, стронция, никеля в крови ( $R^2 = 0,13 - 0,85$ ,  $p < 0,05$ ).

Величины маркеры межклеточной иммунной регуляции (интерлейкин-17 и TNF $\alpha$ ) находились в пределах референтного интервала, однако достоверно отличались от контрольных показателей – снижение интерлейкина-17

в 1,3 раза и повышение содержания TNF $\alpha$ , в среднем в 2,6 раза ( $p < 0,05$ ). Подъем уровня марганца, мышьяка, никеля в крови был ассоциирован с увеличением шансов повышения уровня TNF $\alpha$  ( $R^2 = 0,81 - 0,95$ ,  $p < 0,05$ ).

Исследование особенностей иммунной регуляции костного метаболизма не выявило достоверных отличий содержания RANKL от референтных показателей, в то время как уровень остеопротегерина достоверно превышал норму в 1,3 раза у большей части обследованных ( $p < 0,05$ ). Анализ математических моделей показал достоверное повышение концентрации маркеров костного метаболизма RANKL при увеличении содержания марганца, стронция, свинца в крови ( $R^2 = 0,34 - 0,69$ ,  $p < 0,05$ ).

Таким образом, у взрослого населения, постоянно потребляющего питьевую воду с повышенным содержанием тяжелых металлов, отмечено снижение фагоцитарной активности, продукции сывороточных иммуноглобулинов, повышение специфических антител, изменение продукции цитокинов и маркеров регуляции остеометаболизма.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дианова Д. Г., Долгих О. В. Академический журнал Западной Сибири. 2013, 1, 48-49.
2. Долгих О. В., Кривцов А. В., Гугович А. М., Хархорина Р. А., Ланин Д. В., Лыхина Т. С., Сафонова М. А. Медицина труда и промышленная экология. 2012, 12, 30-33.
3. Zaitseva N. V., Dianova D. G., Dolgykh O. V. European journal of natural history. 2014, 1, 7-8
4. Dolgikh O. V., Kharakhorina R. A., Dianova D. G., Gugovich A. M. Proceedings of the 3rd International Academic Conference «Applied and Fundamental Studies», 2013, 149-152

### FEATURES OF THE IMMUNE INDICATORS AT THE ADULT POPULATION LIVING IN AREAS WITH CONTAMINATION OF DRINKING WATER BY HEAVY METALS

Starkova K. G.<sup>1</sup>, Bezruchenko N. V.<sup>1,2</sup>, Luchnikova V. A.<sup>1</sup>,  
Legostaeva T. A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>FBSI "Federal Scientific Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies";

<sup>2</sup>FSBEI HPE "Perm State National Research University", Perm, Russia

The study of immune regulation at the adult population living in areas with heavy metals exposure was revealed. We established decrease in phagocytic activity and concentration of serum IgG and IgM, increased levels of specific antibodies to strontium, changes of interleukin-17 and TNF $\alpha$ , as well as the ratio of RANKL and osteoprotegerin markers.

## ИЗМЕНЕНИЕ ИММУНОРЕГУЛЯТОРНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ У ДЕТЕЙ В УСЛОВИЯХ ХРОНИЧЕСКОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ ХЛОРООРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ

Зайцева Н. В.<sup>1,2</sup>, Старкова К. Г.<sup>1</sup>, Перминова И. В.<sup>1</sup>,  
Вайсман Я. И.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения»; <sup>2</sup>ФГБОУ ВПО «Пермский государственный национальный исследовательский университет»; <sup>3</sup>ФГБОУ ВПО «Пермский государственный национальный исследовательский политехнический университет», Пермь, Россия

Показано, что у детей в условиях техногенного загрязнения питьевой воды хлорорганическими соединениями наблюдается изменение показателей фагоцитарной активности, а также угнетение продукции сывороточных IgG и IgM и снижение уровня экспрессии CD25<sup>+</sup> и CD95<sup>+</sup> T-клеточных рецепторов на фоне повышения содержания специфических IgG к хлороформу.

*Ключевые слова:* Иммунная система, регуляция, хлорорганические соединения.

Изменение функциональной активности иммунной системы в условиях постоянно возрастающей внешнесредовой химической нагрузки может служить важным индикаторным показателем, особенно учитывая роль иммунных механизмов в патофизиологии многих заболеваний [3]. Актуальной задачей является исследование адаптационного потенциала и иммунных нарушений у детского населения, организм которых чувствительно реагирует на комплексное воздействие факторов среды обитания [1,2].

**Цель работы** – анализ иммунорегуляторных маркеров у детского населения при употреблении питьевой воды с повышенным содержанием хлорорганических соединений.

Проведено иммунологическое диагностическое обследование 93 детей в возрасте от 3 до 7 лет, которые постоянно проживают на территории с повышенным содержанием хлорорганических соединений в воде хозяйственно-бытового водоснабжения. Группу сравнения составили 46 детей из «условно чистого» района.

Для определения содержания органических соединений в биосредах использовали газовую хроматографию в соответствии с МУК 4.1.2116-06. Фенотипические осо-

бенности лимфоцитов исследовали методом проточной цитометрии и мембранной иммунофлуоресценции с использованием панели меченых моноклональных антител к мембранным CD-рецепторам, суммарно регистрируя не менее 10000 событий. Уровни сывороточных иммуноглобулинов изучали методом радиальной иммунодиффузии по Манчини, содержание IgE общего с помощью иммуноферментного анализа. Определение гиперчувствительности по критерию IgG специфический к хлороформу осуществляли методом аллергосорбентного тестирования. Для оценки фагоцитарной активности лейкоцитов использовали формализированные эритроциты барана.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью описательной статистики и двухвыборочного t-критерия Стьюдента, оценку зависимостей между признаками – методом корреляционно-регрессионного анализа с проверкой адекватности моделей на основе расчета критерия Фишера и коэффициента детерминации (R<sup>2</sup>). Различия считались достоверными при  $p < 0,05$ .

Оценка уровня загрязнения питьевой воды на территории наблюдения показала несоответствие принятым гигиеническим нормати-

вам по хлороформу, доля нестандартных проб составляла 78,5–100% от общего количества. В то же время в образцах крови детей группы наблюдения были обнаружены дибромхлорметан, хлороформ и четыреххлористый углерод, превышающие контрольные и фоновые значения.

В результате проведенного клинико-лабораторного исследования состояния здоровья детей были выявлены функциональные нарушения со стороны иммунной системы. Большинство параметров CD-иммунограммы соответствовало референтному диапазону, за исключением выявленного снижения активационных маркеров – CD25<sup>+</sup> у 26,7% обследованных, а также CD95<sup>+</sup> у 63,3% детей группы наблюдения ( $p < 0,05$ ). Кроме того, при проведении сравнительного анализа отмечено достоверное уменьшение абсолютного количества CD25<sup>+</sup>-, CD95<sup>+</sup>- и CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов относительно контрольных значений (в 46,7%, 50% и 56,7% случаев, соответственно). Использование математического моделирования и методического приема оценки шансов изменения биологических тестов при увеличении концентрации контаминантов в биосредах позволило установить снижение количества CD4<sup>+</sup>-, CD25<sup>+</sup>-, CD95<sup>+</sup>-клеток при увеличении содержания хлороформа в крови ( $R^2=0,68-0,87$  при  $p < 0,05$ ).

Выявлено, что в группе обследованных детей показатели фагоцитарного звена иммунного ответа находились в пределах физиологической нормы, однако у большинства детей отмечено повышение по относительному фагоцитозу, фагоцитарному числу и фагоцитарному индексу при сравнении с контрольной группой (в 59,3%, 57,1% и 72,5% случаев, соответственно) ( $p < 0,05$ ). Анализ отношения шансов изменения показателей фагоцитарной активности при возрастании концентрации контаминантов в биологических средах показал достоверное увеличение абсолютного и относительного фагоцитоза при нарастании концентрации четыреххлористого углерода ( $R^2=0,31-0,70$  при  $p < 0,05$ ), а также относительного фагоцитоза при повышении концентрации хлороформа в крови ( $R^2=0,67$  при  $p < 0,05$ ).

Функциональное изменение показателей гуморального иммунитета проявлялось пре-

имущественным дефицитом содержания IgG и IgM у 55,4% и 85,9% обследованных, достоверным по отношению к возрастной норме ( $p < 0,05$ ). Также отмечено снижение уровня IgM по сравнению с аналогичными показателями контрольной группы ( $p < 0,05$ ). Установлено увеличение шансов понижения концентрации IgG при подъеме уровня четыреххлористого углерода в крови ( $R^2=0,71$  при  $p < 0,05$ ).

В то же время в 33,3% случаев показан существенно повышенный уровень общей сенсибилизации, в среднем в 2,5 раза относительно физиологической нормы ( $p < 0,05$ ). Однако достоверных отклонений от показателей группы сравнения не наблюдалось. Одновременно у 41,8% обследованных детей выявлено превышение референтного значения специфической сенсибилизации к хлороформу по критерию IgG, при этом кратность превышения составила в 2,6 раза ( $p < 0,05$ ). Оценка шансов изменения маркеров специфической сенсибилизации в условиях возрастания контаминации биосред позволила установить достоверное увеличение уровня IgG к хлороформу при увеличении концентрации четыреххлористого углерода в крови ( $R^2=0,50$  при  $p < 0,05$ ).

Таким образом, у детей, потребляющих воду с повышенным содержанием хлороорганических соединений, установлены существенные сдвиги в системе маркеров иммунной регуляции, которые проявились изменением показателей фагоцитарной активности, угнетением активационных T-клеточных рецепторов, продукции сывороточных иммуноглобулинов ассоциированных с повышенным уровнем специфической сенсибилизации организма.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Долгих О. В., Зайцева Н. В., Лужецкий К. П., Андреева Е. Е. Российский иммунологический журнал. 2014, 3, 299-302.
2. Зайцева Н. В., Дианова Д. Г., Долгих О. В. Известия Самарского научного центра Российской Академии Наук. 2013, 3 (6), 1779-1782.
3. Dolgikh O., Zaitseva N., Dianova D., Krivtsov A. Molecular markers of apoptosis in industrial workers // In vivo: international Journal of Experimental and Clinical Pathophysiology and Drug Research. – 2011. – Vol. 25. – № 3. – P. 523-524

## CHANGES OF IMMUNOREGULATORY PARAMETERS IN CHILDREN UNDER CHRONIC EXPOSURE TO ORGANOCHLORIDES

Zaitseva N. V.<sup>1,2</sup>, Starkova K. G.<sup>1</sup>, Perminova I. V.<sup>1</sup>, Vaisman Y. I.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>FBSI "Federal Scientific Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies";

<sup>2</sup>FSBEI HPE "Perm State National Research University"; <sup>3</sup>FSBEI HPE "Perm State National Research Polytechnic University", Perm, Russia

We observed that children under technogenic drinking water contamination by organic chlorine compounds showed changes of phagocytic activity, as well as inhibition of the production of serum IgG and IgM and a decrease in the expression level of CD25<sup>+</sup> and CD95<sup>+</sup> T-cell receptors with rising of specific IgG to chloroform.

## ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ КРОВИ В СОПОСТАВЛЕНИИ С ЭХОГРАФИЧЕСКИМИ ПАРАМЕТРАМИ СЕЛЕЗЕНКИ У ДЕТЕЙ С ДИСПЛАЗИЕЙ СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ

Суменко В. В.<sup>1</sup>, Лебедькова С. Е.<sup>1</sup>, Лившиц Н. М.<sup>1</sup>, Климова А. Р.<sup>1</sup>, Трусова О. Ю.<sup>1</sup>, Возгомент О. В.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ГБОУ ВПО «Оренбургский государственный медицинский университет», Оренбург;

<sup>2</sup>ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения», Пермь, Россия

Обследовано 606 детей 6-17 лет 1-й и 2-й групп здоровья с дисплазией соединительной ткани (ДСТ). Изучены иммунный статус крови и эхографические параметры селезенки. У детей с ДСТ выявлены изменения иммунного статуса в виде снижения фагоцитарного показателя, фагоцитарного индекса, содержания CD3<sup>+</sup> клеток, повышения уровня циркулирующих иммунных комплексов, ИЛ-6, ИЛ-8 и ФНОα и увеличения размеров селезенки. Установлена прямая корреляционная связь между размерами селезенки и показателями иммунограммы в пределах третьей степени иммунной дефицитности.

*Ключевые слова:* иммунный статус, дисплазия соединительной ткани.

В последние годы установлена тесная связь между состоянием иммунной системы и синдромом ДСТ [1]. У детей с ДСТ имеются изменения иммунного статуса: снижение функциональной активности клеток моноцитарно/макрофагального звена, содержания Т-лимфоцитов и их субпопуляций, уровня сывороточных иммуноглобулинов (IgA, IgG, IgM) [2], нарушения цитокинового обмена [3]. У детей с ДСТ актуальным является изучение состояния органов, относящихся к иммунной системе, одним из которых является селезенка [4]. Однако до настоящего времени не проводилось комплексное исследование иммунного статуса и эхографических параметров селезенки у детей с ДСТ.

**Цель данного исследования** – определить иммунологические показатели у детей с дисплазией соединительной ткани и сопоставить их с эхографическими параметрами селезенки.

**Методы исследования.** Обследовано 606 детей 6–17 лет 1-й и 2-й групп здоровья с ДСТ. Клинические признаки ДСТ определялись по общепринятым критериям [2]. Для проведения иммунологического обследования было сформировано две группы: в первую группу вошли 225 детей 6–11 лет; во вторую – 210 детей 12–16 лет. В каждой группе были выделены две подгруппы: «А» – дети с умеренными проявлениями основных признаков ДСТ (гиперэластичность кожи, повышенная кровоточи-

вость, гипермобильность суставов не более чем на +), и «Б» – с выраженными проявлениями основных признаков ДСТ (на ++ и +++). Контрольную группу составили дети (464) без признаков ДСТ. Всем детям проводилось ультразвуковое исследование селезенки на аппарате Mindray DC-8 EXP (China). Исследование иммунного статуса проводилось с использованием тестов I и II порядка. Контролем явились региональные нормы показателей иммунного статуса детей, проживающих в Оренбургской области. Для показателей иммунограммы рассчитывали степень иммунной дефицитности (СИД): СИД = (показатель обследуемого / нормальный уровень – 1) x 100%. Статистическую обработку полученных данных проводили методами вариационной статистики из пакета прикладных программ Microsoft Excel и Statistica 10. Различия считались статистически достоверными при  $p < 0,05$ .

**Результаты.** Проведённый анализ иммунологических показателей у детей с ДСТ выявил, что наиболее выраженные изменения средних значений отмечались в 1-Б подгруппе, в виде достоверного снижения ФП  $47,6 \pm 1,4\%$  (в контроле  $53,6 \pm 1,09\%$ ), ФИ  $4,2 \pm 0,09$  (в контроле  $4,7 \pm 0,12$ ), увеличения количества ЦИК  $171,21 \pm 9,4$  ЕД (в контроле  $50,0 \pm 5,0$  ЕД) и во 2-Б подгруппе, где кроме снижения ФП, ФИ, повышения ЦИК, установлено снижение абсолютного количества  $CD3^+$  клеток до  $1,01 \pm 0,06 \cdot 10^9$  (в контроле  $1,32 \pm 0,04 \cdot 10^9$ ), повышение уровней IgG до  $13,56 \pm 0,8$  г/л (в контроле  $10,7 \pm 0,25$  г/л), ИЛ-6 до  $252,08 \pm 9,39$  нг/мл (в контроле  $105,0 \pm 45$  нг/мл), ИЛ-8 до  $1,63 \pm 0,3$  нг/мл (в контроле  $0,21 \pm 0,12$  нг/мл) и ФНО $\alpha$  до  $9,83 \pm 0,46$  нг/мл (в контроле  $1,05 \pm 0,25$  нг/мл).

При анализе степени иммунной дефицитности (СИД) у детей 1-А подгруппы было выявлено, что  $11,4 \pm 2,13\%$  показателей изменялись в пределах второй СИД,  $16,7 \pm 2,5\%$  – в пределах третьей СИД, что в целом составляет  $28,07 \pm 3,02\%$ , в 1-Б подгруппе эти изменения составили  $16,21 \pm 2,4\%$ ,  $25,23 \pm 2,9\%$  и  $41,44 \pm 3,28\%$ , соответственно. Во 2-А подгруппе изменения в пределах второй СИД составляют –  $17,3 \pm 1,89\%$ , в пределах третьей СИД –  $15,38 \pm 1,82\%$ , суммарно –  $32,69 \pm 2,35\%$ , у детей 2-Б подгруппы  $21,74 \pm 2,16\%$ ,  $19,56 \pm 2,12\%$  и  $41,3 \pm 2,62\%$ , соответственно. Таким образом у детей с выраженными проявлениями ДСТ установлено увеличение количества показателей в пределах второй и третьей СИД, по срав-

нению с подгруппой детей с умеренными проявлениями ДСТ.

При проведении ультразвукового исследования селезенки у детей с ДСТ отмечалось достоверное относительное увеличение среднего значения продольного размера селезенки, в возрасте 6-7 лет ( $81,9 \pm 1,46$  мм) и 10-11 лет ( $99,9 \pm 1,19$  мм), по сравнению с контрольной группой ( $77,6 \pm 1,04$  мм и  $87,6 \pm 1,83$  мм, соответственно) и тенденцию к увеличению поперечного размера в 6-7 лет ( $34,0 \pm 0,63$  мм) и 10-11 лет ( $37,3 \pm 0,7$  мм), в контрольной группой ( $32,2 \pm 0,56$  мм и  $35,4 \pm 0,61$  мм, соответственно). Установлена прямая корреляционная связь между размерами селезенки и показателями иммунограммы измененными в пределах третьей СИД ( $r=0,56$ ,  $p < 0,01$ ), уровнем IgG ( $r=0,44$ ), ЦИК ( $r=0,53$ ) и обратная с ФП ( $r=0,49$ ), ФИ ( $r=0,47$ ).

При изучении данных анамнеза было выявлено, что у 318 ( $52,5 \pm 2,0\%$ ) детей с признаками ДСТ в течение 1 года острые заболевания органов дыхания встречались более 2 раз, а у детей без признаков ДСТ у 134 ( $28,9 \pm 2,1\%$ ), достоверно реже. У 46 детей ( $7,6 \pm 1,1\%$ ) с ДСТ достоверно чаще определялась дополнительная селезенка, в контрольной группе у 9 детей –  $1,9 \pm 0,7\%$ . Дополнительная селезенка округлой формы, диаметром от 3,1 до 10,2 мм в среднем 6,34 мм. При проведении корреляционного анализа, была выявлена связь между визуализацией добавочной селезенки и показателями иммунограммы измененными в пределах второй ( $r=0,41$ ) и третьей СИД ( $r=0,82$ ,  $P < 0,001$ ).

**Выводы.** 1. У детей и подростков с ДСТ установлены изменения иммунного статуса крови в виде снижения ФП, ФИ, содержания  $CD3^+$  клеток, повышения уровня IgG, ЦИК, ИЛ-6, ИЛ-8 и ФНО $\alpha$ , при этом с увеличением выраженности проявлений ДСТ достоверно увеличивается глубина иммунологических нарушений, что проявляется в значительном увеличении числа показателей, измененных в пределах второй и третьей степени иммунной дефицитности.

2. Иммунологические параметры, измененные в пределах третьей СИД сочетались с увеличением размеров селезенки и визуализацией дополнительной доли.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Глотов А.В. Автореф. дисс. ... докт. мед. наук. Новосибирск 2003, 39.

2. Наследственные многофакторные нарушения соединительной ткани у детей. Алгоритмы диагностики, тактика ведения. Педиатрия. Журнал имени Г.Н. Сперанского. Приложение. 2014, 5, 40.
3. Bird H. Rheumatology 2007, 46, 902-903.
4. Внутренние болезни по Тинсли Р. Харрисону. Под ред. Э. Фаучи, Ю. Браунвальда, К. Иссельбехера, Дж. Мартина, Д. Каспера, С. Хаузера и Д. Лонга. Практика – Мак – Гроу – Хилл, Москва 2002, 1760.

## IMMUNOLOGICAL PARAMETERS BLOOD AS COMPARED TO THE PARAMETERS SONOGRAPHIC SPLEEN IN CHILDREN WITH CONNECTIVE TISSUE DYSPLASIA

Sumenko V. V.<sup>1</sup>, Lebedkova S. E.<sup>1</sup>, Livshits N. M.<sup>1</sup>, Klimova A. R.<sup>1</sup>,  
Trusova O. Yu.<sup>1</sup>, Vozgoment O. V.<sup>2</sup>

*1Orenburg State Medical University, Ministry of Health, Orenburg; 2"Federal Scientific center of preventive health management health risk", Perm, Russia*

A total of 606 children 6-17 years with connective tissue dysplasia (CTD) without somatic pathology. Children with CTD immune status changes are set in the form of reduced phagocytic index, phagocytic index content CD3<sup>+</sup> cells, increased levels of circulating immune complexes, IL-6, IL-8 and TNF and the enlargement of the spleen. A direct correlation between the size of the spleen and indicators immunograms within the third degree of immune deficiency.

*Keywords:* immune status, connective tissue dysplasia.

## ФАГОЦИТАРНАЯ АКТИВНОСТЬ АЛЬВЕОЛЯРНЫХ МАКРОФАГОВ ПРИ ДИСФУНКЦИИ ДОФАМИНЕРГИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ

Тимофеева М. Р., Лукина С. А.

*ГБОУ ВПО Ижевская государственная медицинская академия, Ижевск, Россия*

Проведена оценка фагоцитарной активности альвеолярных макрофагов при дисфункции дофаминергической системы. Установлено, что нейродегенерация черной субстанции мозга, индуцированная стереотаксическим введением нейротоксина 6-гидроксидофаминна сопровождалась угнетением клеточного звена врожденного иммунитета легких, а блокада D<sub>2</sub>-рецепторов – сохранением фагоцитарной активности альвеолярных макрофагов в условиях двухнедельного введения галоперидола.

*Ключевые слова:* альвеолярные макрофаги, черная субстанция, нейродегенерация, галоперидол.

Дофаминергическая система мозга играет важную роль в механизмах нейроиммунного взаимодействия, оказывая преимущественно иммуностимулирующее влияние, опосредованное действием дофамина на D<sub>1</sub>- и D<sub>2</sub>- рецепторы иммунокомпетентных клеток [1]. Одним из проявлений дисфункции дофаминергической системы является развитие болезни Паркинсона, в основе которой лежит

прогрессирующая дегенерация дофаминсинтезирующих нейронов черной субстанции мозга. Болезнь Паркинсона характеризуется комплексом двигательных и вегетативно-висцеральных расстройств, а также нарушением иммунного статуса и механизмов органной резистентности [2].

Целью работы явилось изучение фагоцитарной активности альвеолярных макро-

фагов при дисфункции дофаминергической системы, моделируемой нейродегенерацией черной субстанции мозга или блокадой  $D_2$ -рецепторов.

**Материалы и методы исследования.** Исследования проведены на крысах-самцах с соблюдением правил работы с лабораторными животными (89/609/ЕС). В первой группе наркотизированным крысам ( $n=9$ ) выполняли одностороннее введение нейротоксина 6-гидроксидофамина (Sigma; 6 мкг) в компактную часть черной субстанции по стереотаксическим координатам атласа мозга G. Paxinos:  $R=5,3$ ;  $L=2,3$ ;  $V=7,6$ . Двигательную активность крыс оценивали через 30 дней в открытом поле. Животным второй группы ( $n=14$ ) осуществляли ежедневное, внутривентральное, в течение двух недель, введение галоперидола (Гедеон Рихтер, Венгрия; 0,5 мг/кг), блокатора дофаминовых  $D_2$ -рецепторов. Крыс тестировали на наличие нейролептической каталепсии. В качестве контроля выступали ложноперирированные животные. После окончания экспериментов получали бронхоальвеолярный лаваж и изучали его клеточный состав по эндопульмональной цитограмме в мазках, окрашенных методом Романовского-Гимзе. Для оценки фагоцитарной активности макрофагов в качестве стандартного объекта фагоцитоза использовали монодисперсные частицы латекса диаметром 1,5 мкм в виде 10% полистирольной суспензии (Россия), рассчитывали фагоцитарный индекс (процент фагоцитирующих клеток) и фагоцитарное число (среднее число зерен латекса, поглощенных одним макрофагом). Статистический анализ выполнен на основе программы Statistica 6.0; распределение и сравнение параметров проводили критериями Шапиро-Уилка, Манна-Уитни; достоверным считали уровень значимости  $p<0,05$ .

**Результаты исследования и их обсуждение.** При исследовании клеточного состава лаважной жидкости на фоне микроинъекции 6-гидроксидофамина в черную субстанцию мозга наблюдали уменьшение числа альвеолярных макрофагов ( $Z=-3,47$ ;  $p=0,001$ ) и снижение доли фагоцитирующих макрофагов ( $Z=-2,79$ ;  $p=0,005$ ). В условиях введения галоперидола в клеточном составе так же определили уменьшение доли альвеолярных макрофагов ( $Z=-3,2$ ;  $p=0,001$ ) на фоне отно-

сительного увеличения числа лимфоцитов ( $Z=-3,83$ ;  $p=0,001$ ), однако, способность альвеолярных макрофагов к фагоцитозу не угнеталась ( $Z=-1,24$ ;  $p=0,21$ ), фагоцитарная активность клеток соответствовала контролю ( $Z=-0,94$ ;  $p=0,35$ ).

Анализ полученных результатов свидетельствует, что более выраженные изменения клеточного звена врожденного иммунитета легких наблюдались при интранигральном введении 6-гидроксидофамина. Это может быть обусловлено недостаточностью nigrostriатной дофаминергической системы, являющейся основным источником церебрального дофамина и входящей в структуру центрального аппарата нервной регуляции функций иммунной системы, а так же дофаминовой дисфункцией гипоталамуса, имеющего эфферентные выходы на органы нейроиммунорегуляции [2, 5]. Блокада центральных и периферических дофаминовых  $D_2$ -рецепторов в условиях системного введения галоперидола сопровождалась сохранением фагоцитарной активности альвеолярных макрофагов в связи с возможным влиянием медиатора на  $D_1$ - или  $\alpha_1$ -адренорецепторы иммунокомпетентных клеток [4]. Не исключено, что отсутствие выраженного эффекта препарата связано с непродолжительным введением нейролептика [3].

**Выводы.** Дисфункция дофаминергической системы, индуцированная микроинъекцией нейротоксина 6-гидроксидофамина в черную субстанцию мозга сопровождалась угнетением клеточного звена врожденного иммунитета легких, при блокаде  $D_2$ -рецепторов фагоцитарная активность альвеолярных макрофагов сохранялась в условиях двухнедельного введения галоперидола.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Альперина Е. Л., Геворгян М. М. // Бюллетень СО РАМН. 125 (3): 73–76. 2007.
2. Крыжановский Г. Н., Акмаев И. Г., Магаева С. В., Морозов С. Г. Нейроиммуноэндокринные взаимодействия в норме и патологии. – М.: Медицинская книга. – 2010. – 288 с.
3. Madej A, Belowski D, Kowalski J, Herman Z. S // Boll Chim Farm. 137 (5): 135–9. 1998.
4. McKenna F, McLaughlin P. J., Lewis B. J. et al. // J. Neuroimmunol. 132 (1–2): 34–40. 2002.
5. Politis M., Piccini P., Pavese N. et al. // J. Exp Neurol. 214 (1): 112–116. 2008.

## PHAGOCYTIC ACTIVITY OF ALVEOLAR MACROPHAGES WITH DYSFUNCTION OF THE DOPAMINERGIC SYSTEM

Timofeeva M. R., Lukina S. A.

*SBEI HPT "Izhevsk State Medical Academy", Izhevsk, Russia*

The evaluation of the phagocytic activity of alveolar macrophages with dysfunction of the dopaminergic system. It was established that the substantia nigra of the brain neurodegeneration induced by stereotactic administration of the neurotoxin 6-hydroxydopamine was accompanied by inhibition of the cellular component of innate immunity lungs, and D<sub>2</sub>-receptor blockade – preserving the phagocytic activity of alveolar macrophages in a two-week administration of haloperidol.

*Key words:* alveolar macrophages, substantia nigra, neurodegeneration, haloperidol.

## ХАРАКТЕРИСТИКА ОСТРОЙ И ЭФФЕКТОРНОЙ ФАЗЫ АЛЛЕРГИЧЕСКОГО ВОСПАЛЕНИЯ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ С ЦЕЛЬЮ ПОДБОРА ПАРАМЕТРОВ ДЛЯ ОЦЕНКИ РЕГУЛЯТОРНЫХ СВОЙСТВ БТШ70

Троянова Н. И.<sup>1</sup>, Постовская А. М.<sup>1,2</sup>, Сервули Е. А.<sup>1,3</sup>,  
Сапожников А. М.<sup>1</sup>, Шевченко М. А.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН; <sup>2</sup>ФГБОУВО Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова; <sup>3</sup>ГБУ ВПО Российский государственный медицинский университет им. Н. И. Пирогова, Москва, Россия

Аллергическая астма – комплексное заболевание, определяющей характеристикой которого является пролиферация Т-хелперных лимфоцитов 2 типа в ответ на вдыхаемые аэроаллергены. Множество факторов, таких как эозинофилия, проаллергические цитокины и т.д., включены в воспалительный каскад при астме. Внеклеточный пул белков теплового шока 70 кДа (БТШ70) оказывает модулирующее действие на воспалительные процессы различной природы. В данной работе проведен анализ изменения основных параметров аллергического иммунного ответа от острой к эффекторной фазе аллергического воспаления дыхательных путей, проведена оценка регуляторных свойств БТШ70 и сформулированы основные критерии оценки эффектов иммуномодуляторов в аллергическом воспалении. Было продемонстрировано, что увеличение концентрации внеклеточного БТШ70 в острой фазе аллергического воспаления ограничивает приток эозинофилов в дыхательные пути, препятствует повышению уровней аллерген-специфичных IgA в лаважной жидкости и IgG1 и IgE в сыворотке периферической крови, а так же снижает уровень проаллергических цитокинов – IL-4, IL-5 и IL-13 в бронхоальвеолярных смывах.

*Ключевые слова:* аллергическое воспаление дыхательных путей, системная модель, БТШ70.

Астма является комплексным заболеванием, обусловленным множеством факторов и характеризующимся такими проявлениями как эозинофилия дыхательных путей, гиперплазия бокаловидных клеток, бронхиальная гиперчувствительность и обструкция дыха-

тельных путей. Центральную роль в аллергическом воспалении дыхательных путей играют Тх2-лимфоциты, которые инфильтрируют легкие наряду с эозинофилами, тучными клетками и антиген-презентирующими дендритными клетками. Многочисленные медиаторы



воспаления, в том числе лейкотриены, простагландины, цитокины, нейропептиды, компоненты комплемента, АТФ и аденозин включаются в нисходящий воспалительный каскад [1]. В процессе развития воспаления уровень секреции различных провоспалительных медиаторов изменяется в зависимости от стадии процесса. При этом выделяют специфические маркеры острой фазы воспаления – белки, концентрация которых возрастает в первые сутки развития воспаления и незначительна на более поздних стадиях [2]. Во многом это обусловлено изменениями в клеточном составе инфильтратов. В то же время, источником одних и тех же медиаторов могут служить различные популяции лейкоцитов [3]. Как и в большинстве воспалительных процессов, в аллергическом воспалении можно выделить острую и эффекторную фазы, для каждой из которых характерны свои маркеры [4].

**Целью данной работы** было проследить изменение основных параметров аллергического иммунного ответа от острой к эффекторной фазе аллергического воспаления дыхательных путей и сформировать критерии для дальнейшей оценки регуляторных свойств БТШ70.

В исследовании использовали стандартную модель овальбумин-индуцированной астмы с применением двух интраперитонеальных инъекций (день 0 и 7 от начала эксперимента) 10 мкг/мышь/инъекцию овальбумина, адсорбированного на корпускулярном носителе (алюминиевые квасцы), и трех последующих ингаляций (день 19, 20, 21) 1% раствора овальбумина в фосфатном буфере мышам линии BALB/c. Для оценки иммуномодулирующего действия БТШ70 белок вводили мышам в форме интрафарингеальных ингаляций в острой фазе воспаления (через 24 часа после последней ингаляции овальбумина) в дозе 1 мкг/мышь. Уровень цитокинов и иммуноглобулинов в бронхоальвеолярных смывах, а также уровень иммуноглобулинов в периферической крови измеряли при помощи иммуноферментного анализа. Уровень АТФ в лаважной жидкости определяли с помощью основанной на люциферин-люциферазной реакции системы для определения АТФ. Анализ клеточного состава бронхоальвеолярных лаважей был проведен при помощи дифференциального окрашивания препаратов с последующей идентификацией клеток по морфологическим признакам.

Острая фаза была определена исходя из повышенного уровня маркеров острой фазы: АТФ, IL-6 и IL-1 $\beta$  – в бронхоальвеолярных смывах. Через 24 часа после последней ингаляции аллергена уровни этих маркеров были значительно выше, чем через 48 часов. В острой фазе также наблюдали массовый приток нейтрофилов в дыхательные пути. В отсутствие новой ингаляции аллергена уровень нейтрофилов достоверно снижался на 48 часов по сравнению с острой фазой воспаления. Тенденции к уменьшению общего количества клеток за счет снижения уровня нейтрофилов замечено не было, так как в процессе развития воспаления возрастало число эозинофилов. При этом количество макрофагов и лимфоцитов в бронхиальных смывах оставалось неизменным. Анализ изменения концентрации проаллергических цитокинов от острой к эффекторной фазе воспаления показал, что уровень IL-4 достоверно увеличивался, а содержание IL-5 и IL-13 в отсутствие новых ингаляций не претерпевало достоверных изменений в промежутке между 24 и 48 часами после последней ингаляции аллергена. Анализ секреции аллерген-специфических иммуноглобулинов выявил достоверный рост уровней IgE и IgG1 в сыворотке периферической крови и тенденцию к увеличению уровня IgA в лаважной жидкости от острой к эффекторной фазе. Уровень аллерген-специфического IgG1 в лаважной жидкости достоверно не изменялся.

Иммуномодулирующее действие подразумевает разнонаправленное воздействие на различные параметры воспаления. В связи с этим представляется крайне важным правильный подбор параметров для характеристики иммуномодулирующих свойств того или иного препарата. Для оценки иммуномодулирующего действия БТШ70 при введении его мышам в острой фазе аллергического воспаления дыхательных путей использовали не только параметры, прямо коррелирующие с развитием воспаления, но и показатели, не претерпевавшие изменений от острой к эффекторной фазе воспаления. Концентрация всех исследованных проаллергических цитокинов (IL-4, IL-5, IL-13) в бронхоальвеолярных смывах мышей, получавших БТШ70, достоверно снижалась по сравнению с контрольной группой мышей с индуцированным воспалением. Ингаляции БТШ70 также приводили к достоверно-

му снижению локального уровня аллерген-специфичного IgA, а также уровня IgG1 и IgE в сыворотке периферической крови. Следует отметить, что у мышей, получавших ингаляции БТШ70, не наблюдалось роста общего количества клеток в бронхоальвеолярных смывах от острой к эффекторной фазе, в отличие от контрольной группы. Это свидетельствует о способности БТШ70 подавлять развитие воспаления. При этом у мышей, получавших ингаляции БТШ70, процент нейтрофилов в эффекторной фазе (через 48 часов после последней ингаляции аллергена) значительно превышал этот показатель у контрольных мышей с индуцированным воспалением дыхательных путей.

Таким образом, на основании характеристик острой и эффекторной фаз аллергического воспаления дыхательных путей разработана эффективная модель для оценки влияния БТШ70 и других иммуномодуляторов на развитие воспалительного процесса. В качестве основных критериев оценки были выбраны:

изменение общего количества и популяционного состава клеток бронхо-альвеолярных лаважей; изменение уровня проаллергических цитокинов IL-4, IL-5 и IL-13 и аллерген-специфичных IgA и IgG1. Было продемонстрировано, что увеличение концентрации внеклеточного БТШ70 в острой фазе аллергического воспаления ограничивает приток эозинофилов в дыхательные пути, препятствует повышению уровней специфических IgA в лаважной жидкости и IgG1 в сыворотке периферической крови, а также снижает уровень проаллергических цитокинов – IL-4, IL-5 и IL-13 в бронхоальвеолярных смывах.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Idzko M., Hammad H. et al. *Nat Med* 2007, 13 (8), 913–9.
2. Lommatzsch M., Julius P. et al. *J Allergy Clin Immunol* 2006, 118, (1), 91–7.
3. Saglani S., Mathie S. A. et al. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2009 Sep;41 (3):281–9.
4. Baelder R., Fuchs B. et al. *J Immunol.* 2005 Jan 15;174 (2):783–9.

### CHARACTERIZATION OF ACUTE AND EFFECTOR PHASE OF ALLERGIC AIRWAY INFLAMMATION AND DETERMINATION OF INFLAMMATION PARAMETERS SUITABLE FOR HSP70 MODULATORY EFFECTS ESTIMATION

Troyanova N. I.<sup>1</sup>, Postovskaya A. M.<sup>1,2</sup>, Servuli E. A.<sup>1,3</sup>, Sapozhnikov A. M.<sup>1</sup>, Shevchenko M. A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS; <sup>2</sup>Lomonosov Moscow State University; <sup>3</sup>Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia*

Allergic asthma is a complex Th2 lymphocyte-associated disease mediated by multiple factors like eosinophils, cytokines and others. In this paper we analyze changes in general parameters of allergic inflammation between acute and effector phases and evaluate effects of exogenous Hsp70 application upon induced allergic airway inflammation. It was shown that Hsp70 application at acute phase of inflammation decreased total BAL cell number and eosinophil percentage, maintained neutrophil infiltration at 48 h after the allergen challenge. The level of OVA-specific peripheral blood IgG1 and IgE and BAL fluid IgA was significantly higher in control mice with induced asthma compared to the group that received Hsp70 inhalation. The pro-allergic cytokine concentration significantly decreased in mice treated with Hsp70 compared to non-treated mice with induced allergic inflammation. Thus, elevation of extracellular Hsp70 concentration in the airway is potent to protect from allergic airway inflammation manifestation.

## ОСОБЕННОСТИ ИММУНО-ГОРМОНАЛЬНОГО СТАТУСА У ЖИТЕЛЬНИЦ СЕВЕРА

Туманова М. С.

*Федеральное государственное бюджетное учреждение Институт физиологии природных адаптаций Уральского отделения Российской академии наук, Архангельск, Россия*

Представляло интерес изучить состояние иммунологической реактивности у женщин – северянок, проживающих в экстремальных климатозоологических условиях Приполярного региона Европейского Севера, до 30 лет, с учетом содержания гормона пролактина. Почти у 80% архангелогородок зафиксированы высокие уровни иммуносупрессии. Дефицит Т-хелперов значительно чаще встречался у женщин-чумработниц в 40% случаев; на фоне повышенной у 45% респондентов иммуносупрессии. Высокая частота встречаемости (59–100%) выявленных иммунных дисбалансов у молодых женщин регистрируется на фоне Т-клеточного дефицита CD4<sup>+</sup> и не высокой концентрации пролактина ( $p < 0,01$ ), указанная закономерность в 3 раза чаще встречается и более выражена у женщин г. Архангельска.

*Ключевые слова:* женщины, иммунная система, пролактин.

Влияние социальных и экологических факторов внешней среды откладывает отпечаток на показатели здоровья женщин на Севере, в частности на иммунную и репродуктивную системы [2,3]. Состояние здоровья женщин на Севере вызывает тревогу в связи с уменьшением рождаемости [1]. Иммунная система является наиболее чувствительной системой, индикатором адаптационных реакций организма, отражающая степень напряжения в ответ на любое стрессорное воздействие среды [4,5]. Пролактин, являющийся одним из главных гормонов в репродуктивной системе, влияет на овуляционные циклы женщины, обеспечивает защиту иммунной системы от инфекций и воспаления. При гиперпролактинемии нарушаются менструальные циклы женщины, развивается бесплодие. Понижение содержания пролактина может указывать на недостаточную функцию гипофиза [1].

**Цель** – определить особенности иммунного статуса с учетом концентраций пролактина у женщин в возрасте до 30 лет на Севере.

Проведено иммунологическое обследование у 91 женщины в возрасте 21-30 лет: 59 жительниц г. Архангельска (64.55° с.ш., 40.53° в.д.), 25 женщин-чумработниц, родившихся и выросших в поселке Несь, Канинской тундры Ненецкого автономного округа (66.6° с.ш., 44.67° в.д.), 7 женщин, жительниц по-

селка Ревда, Мурманской области (67.93° с.ш., 34.56° в.д.) по результатам экспедиций 2009–2014 гг., проходивших в зимний период.

Комплекс иммунологического обследования включал изучение гемограммы, фенотипирование лимфоцитов (CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>) с помощью непрямой иммунопероксидазной реакции с использованием моноклональных антител (НИЦ «МедБиоСпектр», Москва) на препаратах лимфоцитов типа «высушенной капли». Кровь для анализа брали из локтевой вены в объеме 6 мл в 9-10 часов утра, натощак. Заборы крови осуществляли в вакутайнеры с литий-гепарином фирмы «IMPROVACUTER». Определение уровня содержания гормона пролактина проведено с помощью метода иммуноферментного анализа с помощью набора «HumanGmbH», Германия. Проведена статистическая обработка с помощью пакета прикладных программ, MicrosoftExcel 10, Statistica 6.0.

Анализ показал, что уровень лейкоцитов низкий во всех обследуемых группах, при этом у чумработниц поселка Несь почти в 1,5 раза ниже, чем у архангелогородок ( $4,67 \pm 0,31 \cdot 10^9$  кл/л.) и составляет  $3,79 \pm 1,26 \cdot 10^9$  кл/л. Уровень содержания лейкоцитов у жительниц поселка Ревда находится на верхних границах физиологической нормы и составляет  $7,13 \pm 1,01 \cdot 10^9$  кл/л. Содержание нейтрофилов у архангелогородок составля-

ет  $1,7 \pm 0,25 \cdot 10^9$  кл/л, у чумработниц  $1,94 \pm 0,97 \cdot 10^9$  кл/л, у жительниц поселка Ревда данный показатель находится на верхней границе нормы и составляет  $3,57 \pm 0,56 \cdot 10^9$  кл/л., что выше физиологической нормы ( $3,5 \cdot 10^9$  кл/л).

Важно отметить, что концентрация лимфоидных клеток моноцитов у жительниц Ревды превышает таковые у жительниц поселка Несь почти в 2 раза и составляет  $0,41 \pm 0,06 \cdot 10^9$  кл/л., что выходит за рамки физиологической нормы. Содержание хелперов  $CD4^+$  регистрируется на самой высокой физиологической границе у жительниц г. Архангельска и составляет  $0,72 \pm 0,09 \cdot 10^9$  кл/л., пониженное содержание хелперов  $CD4^+$  выявлено у женщин – чумработниц поселка Несь и составляет  $0,22 \pm 0,07 \cdot 10^9$  кл/л., у жительниц Ревды также регистрируется снижение хелперной активности ( $0,5 \pm 0,17 \cdot 10^9$  кл/л.). Содержание супрессоров  $CD8^+$  в значительной степени превышает известные физиологические пределы у жительниц Архангельска, данный показатель составляет  $0,61 \pm 0,07 \cdot 10^9$  кл/л., при норме содержания  $0,2 - 0,4 \cdot 10^9$  кл/л. Кроме того, у всех молодых женщин, жительниц поселка Несь, отмечается выраженный дефицит исследуемых иммунологических параметров за исключением супрессоров  $CD8^+$ . Уровень содержания рецепторов супрессорной активности  $CD8^+$  у жительниц поселка Ревда составляет  $0,37 \pm 0,12 \cdot 10^9$  кл/л.

У 80% архангелогородок зафиксированы высокие уровни иммуносупрессии. Дефицит Т-хелперов значительно чаще встречался у женщин-чумработниц в 40% случаев.

Представляло интерес изучить внутрисистемные корреляционные взаимосвязи между иммунологическими параметрами и гормоном пролактином. Анализ показал, что у жительниц пос. Несь выявлено достаточное количество сильных корреляций исключительно между иммунологическими параметрами. Прямых корреляционных взаимосвязей иммунологических параметров с концентрацией пролактина не выявлено. При этом отчетливо коррелируют между собой клетки, отражающие процессы хелперной активности и иммуносупрессии, с силой связи от 0,72 до 0,94,  $p < 0,001$ .

У жительниц Архангельска, напротив, достаточно сильная корреляционная взаимосвязь выявлена между пролактином и иммуносупрессией. На фоне указанных корреляционных

взаимоотношений появляется дополнительная их корреляция между пролактином, цитотоксическими клетками ( $CD8$ ) и В-клетками ( $r=0,82$ ;  $p < 0,001$ ).

При оценке корреляционных взаимосвязей между иммунологическими параметрами и уровнем гормона пролактина у жительниц поселка Ревда также выявлено достаточное количество сильных корреляций исключительно между иммунологическими параметрами с силой связи от 0,9 до 0,99.

Следует предположить, что выявленное количество и разнообразие иммунных дисбалансов у жительниц Архангельска косвенно подтверждается наибольшим количеством жестких взаимосвязей между обследуемыми иммунными параметрами, выраженной супрессией, связанной с невысокими концентрациями пролактина (сила связи от 0,67 до 0,84).

В условиях экстремальных климато-экологических и профессиональных воздействий на Севере у жительниц г. Архангельска 21-30 лет регистрируется выраженная нейтрофильная (50,8%) и Т-клеточная недостаточность (100%). У чумработниц пос. Несь НАО, женщин в возрасте 21-30 лет регистрируется лейкопения, лимфоцитарная недостаточность в 20% случаях, снижена концентрация Т-хелперов/индукторов ( $CD4^+$ ) и цитотоксических лимфоцитов ( $CD8^+$ ) в 40% случаях. У жительниц поселка Ревда, Мурманской области, регистрируется повышенное содержание нейтрофилов в 100% случаев.

Уровни пролактина во всех обследуемых группах зарегистрированы несколько ниже средней физиологической величины и составили  $7,62 \pm 2,2$  нг/мл у архангелогородок;  $7,53 \pm 4,4$  нг/мл у жительниц поселка Несь и  $9,34 \pm 2,4$  нг/мл у жительниц поселка Ревда.

Таким образом, высокая частота встречаемости (59–100%) выявленных иммунных дисбалансов у молодых женщин регистрируется на фоне Т-клеточного дефицита  $CD4^+$  и не высокой концентрации пролактина ( $p < 0,01$ ), указанная закономерность в 3 раза чаще встречается и более выражена у женщин г. Архангельска.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Корниенко Е. Б. автореф. дис. канд. мед. наук: 03.00.13 / Е. Б. Корниенко; Арханг. Гос. Мед. Акад. – Архангельск, 2002. – 18 с.

2. Щёголева Л. С., Туманова М. С., Шашкова Е. Ю., Филиппова О. Е. // Российский иммунологический журнал. Тематический выпуск к IX Всероссийской конференции с международным участием «Иммунологические чтения в г. Челябинске», т. 8 (17), № 2–3 (1), апрель-сентябрь 2014 г. – с. 178-180.
3. Туманова М. С., Стирманова А. Ю., Бичкаев А. А. // Вестник Уральской медицинской академической науки – Екатеринбург, 2014. № 2 (48), 2014 г. – с. 100-102.
4. Шашкова Е. Ю., Щёголева Л. С. Физиологические реакции иммунной системы у студентов Северных ВУЗов (Монография), Германия, 2013.–160с.
5. Щёголева Л. С. Резервные возможности иммунного гомеостаза у человека на Севере. Екатеринбург: УрО РАН.– 2007,– с. 207.

## FEATURES OF THE IMMUNE-HORMONAL STATUS IN A RESIDENT OF THE NORTH TO 30 YEARS

Tumanova M. S.

*Institute of Environmental Physiology, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences,  
Arkhangelsk, Russia*

It was interested to study a conditional of immunological reactivity in women of northern living in extreme climatic and ecological conditions of polar regions of the European North, to 30 years, taking into account the content of the prolactin hormone. Almost 80% resident women of the city of Arkhangelsk recorded high levels of immunosuppression. Deficiency of T-helper cells is much more common in chum-keeper in 40% of cases; against the background of increased in 45% of the respondents immunosuppression. The high frequency of occurrence (59–100%) identified immune imbalances registered in young women on the background of the T-cell deficiency CD4<sup>+</sup> and high concentrations of prolactin ( $p < 0,01$ ), This regularity is found in 3 times more common and more more pronounced in women of Arkhangelsk.

## ВЛИЯНИЕ КАПСАИЦИНОВОЙ БЛОКАДЫ БЛУЖДАЮЩЕГО НЕРВА НА АКТИВНОСТЬ АЛЬВЕОЛЯРНЫХ МАКРОФАГОВ ПРИ ИШЕМИИ МОЗГА

Уракова М. А., Брындина И. Г.

*ГБОУ ВПО «Ижевская государственная медицинская академия», Ижевск, Россия*

Исследованы эндопульмональная цитограмма и функциональная активность альвеолярных макрофагов при перевязке общих сонных артерий у крыс в условиях двусторонней капсаициновой блокады блуждающего нерва. Поглотительную активность клеток оценивали путем подсчета фагоцитарного индекса, фагоцитарного числа и индекса завершенности фагоцитоза. Показано, что при экспериментальной ишемии головного мозга наблюдается снижение функциональной активности альвеолярных макрофагов. При истощении депо нейропептидов в капсаицин-чувствительных афферентах блуждающего нерва происходит ещё более выраженное ухудшение изучаемых показателей.

*Ключевые слова:* альвеолярные макрофаги, ишемия мозга, капсаицин, блуждающий нерв.

К настоящему времени известно, что постинсультные инфекционные осложнения, развивающиеся у 21–65% пациентов с данной патологией, являются важным фактором риска развития летального исхода. Повышенная

частота пневмоний при инсульте обусловлена как возможным угнетением бульбарных рефлексов, длительным постельным режимом, так и дизрегуляцией иммунной системы. Взаимосвязь инсульта и последующего наруше-

ния адаптивного иммунного ответа изучена достаточно хорошо. Менее подробно изучены механизмы изменения врожденного иммунитета легких, развивающиеся после нарушения мозгового кровообращения. В ранее проведенных нами исследованиях выявлено изменение функциональной активности альвеолярных макрофагов при различных повреждениях головного мозга [1]. Haiya B. et al. [4] выделяют легочный воспалительный парасимпатический рефлекс, доказывая значимую роль блуждающего нерва в развитии пневмонии в постинсультный период. Однако механизмы влияния вагуса на развитие воспаления легких при цереброваскулярной патологии изучены остаются до конца не изученными. Вместе с тем, показано влияние капсаицинового воздействия на вагус при ишемии мозга на другие показатели системы дыхания [3], одновременно установлена роль вагусной капсаициновой блокады в изменении состояния альвеолярных макрофагов при экспериментальном аутоиммунном энцефаломиелите [2].

Целью исследования стало изучение функциональной активности альвеолярных макрофагов при экспериментальном ишемическом инсульте в условиях капсаициновой блокады блуждающего нерва.

Эксперимент выполнен на 30 крысах-самцах массой 180–200 г. Исследование проводилось с соблюдением требований Европейской конвенции (Страсбург, 1986) по содержанию, кормлению и уходу за подопытными животными, а также выводу их из эксперимента и последующей утилизации. Ишемию мозга моделировали путем двусторонней перевязки общих сонных артерий (n=10). В качестве контроля использовали ложнопериорированных животных, у которых выделяли общие сонные артерии без их последующей перевязки (n=10). Блокаду блуждающего нерва осуществляли посредством двусторонней аппликации 50мкМ капсаицина на изолированную шейную часть блуждающего нерва (n=10). Спустя 3 суток у всех крыс путем лаважа получали бронхо-альвеолярные смывы (БАС). Из клеточной взвеси, полученной после центрифугирования БАС, готовили мазки, окрашивали их по Романовскому-Гимзе для подсчета эндопульмональной цитогаммы. Для определения поглотительной активности альвеолярных макрофагов подсчитывали фагоцитарный индекс (ФИ) – процент фагоцитирующих клеток

и фагоцитарное число (ФЧ) – среднее число объектов фагоцитоза (дрожжей), поглощенное одной клеткой спустя 30 и 120 минут инкубации. Подсчитывали индекс завершенности фагоцитоза (ИЗФ) – ФЧ 30/ФЧ 120. Обработка статистических данных выполнена на основе пакета прикладных компьютерных программ “Microsoft Excel 2007” и “SPSS” for Windows. Нормальность распределения признака в выборке определяли по W-критерию Шапиро-Уилка. Достоверность отличий изучаемых параметров между группами оценивали с помощью критерия Стьюдента. Различия выборок считали статистически достоверными при уровне значимости  $p < 0,05$ . Данные представлены в виде среднего арифметического и стандартной ошибки среднего арифметического.

**Результаты.** В ходе проведенных исследований установлено, что ишемия головного мозга сопровождалась уменьшением количества лимфоцитов с  $39,4 \pm 1,5\%$  в контроле до  $27,00 \pm 2,00\%$  и увеличением альвеолярных макрофагов – с  $57,20 \pm 2,30\%$  до  $70,0 \pm 2,00\%$  ( $p < 0,05$ ). Известно, что являясь “первой линией защиты” легких, альвеолярные макрофаги обладают сильным фагоцитарным и бактерицидным потенциалом. Изучение поглотительной способности альвеолярных макрофагов в условиях ишемии мозга выявило снижение ФИ на 34% и 43%, ФЧ на 12% и 47% спустя 30 и 120 минут соответственно и уменьшение ИЗФ на 40% в сравнении с данными, полученными на ложнопериорированных животных ( $p < 0,05$ ).

Капсаициновая блокада блуждающего нерва на фоне ишемии головного мозга приводила к восстановлению содержания альвеолярных макрофагов и лимфоцитов в бронхо-альвеолярных смывах до  $59,00 \pm 1,8\%$  и  $38,8 \pm 1,9\%$  соответственно, что не отличалось от контрольных значений ( $p > 0,05$ ). Одновременно наблюдалось снижение показателей поглотительной активности альвеолярных макрофагов, как по сравнению с контролем, так и с ишемией без капсаициновой блокады. ФИ при этом уменьшался на 59 и 38% спустя 30 и 120 минут в отличие от данных при ишемии без дополнительных воздействий ( $p < 0,05$ ). ФЧ снижалось на 40% через 30 минут и на 43% через 120 минут от начала инкубации с объектами фагоцитоза ( $p < 0,05$ ).

Известно, что присутствующая в афферентах блуждающего нерва субстанция P, индуцирует активацию фагоцитоза альвеолярных

макрофагов и выделение ими ФНО-а [5]. По-видимому, влияние капсаицина в дозе 50 мкМ (вызывающей нейросенситизацию и истощение выделения субстанции Р), исключает активирующее влияние данного нейропептида на фагоцитарную активность альвеолярных макрофагов.

Таким образом, двусторонняя капсаициновая блокада блуждающего нерва при ишемии головного мозга нивелирует изменения клеточного состава бронхо-альвеолярных смывов и одновременно усиливает снижение поглотительной активности альвеолярных макрофагов, вызванные ишемией. Полученные результаты свидетельствуют об участии капсаицин-зависимых механизмов в реализации эффекторных вагусных влияний на кле-

точные факторы врожденного иммунитета легких при ишемии головного мозга.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Уракова М. А., Брындина И. Г. // «Нейронаука для медицины и психологии»: 9-й Международный Междисциплинарный Конгресс. Труды Конгресса. – М.: МАКС ПРЕСС, 2013. – С. 336.
2. Уракова М. А., Брындина И. Г. // Патогенез. – 2014. – С.69-70.
3. Уракова М. А., Брындина И. Г. // Росс. физиол. журн. им. Сеченова. – 2015. – Т. 101, № 3. С. 308-315.
4. Haiya W., Ling L., Xiao S. // Biomed Res Int. – 2014: 283525.
5. Rogers D. P., Wyatt C. R., Walz P. H. et al. // Vet. Immunol. Immunopathol. – 2006. – V.112, № (3–4). – P.290-295.

## THE INFLUENCE OF CAPSAICIN BLOCKADE OF VAGUS NERVE ON THE ACTIVITY OF ALVEOLAR MACROPHAGES IN CEREBRAL ISCHEMIA

Urakova M. A., Bryndina I. G.

*Izhevsk State Medical Academy, Izhevsk, Russia*

In the present work the endopulmonary cytogram and functional activity of alveolar macrophages after the bilateral capsaicin blockade of vagus nerve in rats with common carotid arteries ligation were investigated. The uptake activity of the cells was evaluated by counting the phagocytic index, phagocytic number and index of completeness of phagocytosis. It is shown that the functional activity of alveolar macrophages decreased under the experimental cerebral ischemia. After the depletion of neuropeptides depot in vagal capsaicin-sensitive afferents the changes of the studied indices became more significant.

*Key words:* alveolar macrophages, cerebral ischemia, capsaicin, vagus nerve.

## ВЛИЯНИЕ ФАКТОРОВ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ НА ИММУНИТЕТ И СОСТОЯНИЕ ЗДОРОВЬЯ РАБОТАЮЩЕГО НАСЕЛЕНИЯ

Мартынов А. И., Феофанова Т. В., Федоскова Т. Г.

ФГБУ "ГНЦ Институт иммунологии" ФМБА России, Москва, Россия

Представлены результаты оценки связи физического здоровья и параметров иммунитета работников промышленного производства с учетом условий их труда. Показано, что физическое здоровье имеет связь с теми параметрами иммунитета, которые входят в корреляционные связи, меняющие свой знак при сравнении двух групп, имеющих разные условия труда.

*Ключевые слова:* производственный фактор, иммунитет, здоровье населения.

В настоящее время примерно 30% трудоспособного населения России работает на производстве, где действует тот или иной производственный фактор. При этом до 40% заболеваний у этих лиц прямо или косвенно связано с неудовлетворительными условиями труда (Минздравсоцразвития РФ, доклад «О реализации государственной политики в области охраны труда в Российской Федерации в 2008 г.» [1]).

Негативному воздействию физических, химических и биологических факторов подвержены многие органы и системы человеческого организма, в частности, система иммунитета. В связи с этим, с одной стороны, актуальным является оценка действия этих факторов на иммунную систему человека, с другой стороны, – поиск возможной связи между состоянием здоровья работников производства и показателями их иммунного статуса (ИС).

В рамках данного исследования нами были проведены: а) анализ корреляционных связей (КС) между показателями ИС лиц, работающих на промышленном предприятии с учетом условий их труда; 2) оценка связи их состояния здоровья с показателями ИС и условиями труда. Условия труда характеризовали наличием (или отсутствием) контакта с производственным фактором (ПФ). Для количественной оценки действия ПФ был выбран стаж работы в условиях контакта с ПФ (стажПФ). Индивидуальная характеристика состояния физического здоровья обследованных была определена как число заболеваний

(the number of diseases, ND), имевшихся у каждого из них к началу исследования [2]. Показатель ND включал хронические заболевания, ежегодные острые респираторные вирусные инфекции, травмы, перенесенные операции. В качестве индивидуальной характеристики иммунной системы использовали показатели иммунного статуса, определяемые в крови (leuk, lymph, CD3, CD4, CD8, CD16, CD19 (в абсолютных количествах и %), IRI, FAGn, FAGm, IgE, IgG, IgA, IgM) и слюне – показатели мукозального иммунитета (IgG-sal, IgA-sal, s-IgA-sal). Влияние факторов окружающей среды (в данном случае ПФ) на показатели ИС определяли по наличию статистически значимой ( $p < 0,05$ ) инверсии знаков КС между показателями ИС при сравнении их в группах с разными условиями труда. Показатели, для которых были выявлены инверсии знака КС, считали чувствительными к действию ПФ и только их использовали в дальнейшем для оценки связи с состоянием здоровья. Дополнительно оценивали их связи и связь показателя ND со стажем ПФ. При расчетах применяли непараметрические методы статистики (при сравнении групп – критерий Манн-Уитни, точный критерий Фишера (ТКФ); при оценке связей – метод ранговой корреляции Спирмена ( $R, r$ ) с  $p < 0,05$  для статистически значимых различий и с  $0,05 < r \leq 0,20$  – для тенденций). Для устранения возможного влияния на анализируемые показатели обследованных лиц возраста и стажа с ПФ проводили расчет частных коэффициентов корреляции ( $R_p, r_p$ ).



В исследование были включены 139 человек (58 мужчин и 78 женщин), часть из которых работала в условиях контакта с ПФ. Так как предварительный анализ данных выявил статистически значимые различия в распределении по полу лиц, имевших и не имевших контакта с ПФ (ТКФ,  $p < 0,00001$ ), все последующие расчеты были выполнены отдельно для мужчин и женщин. С этой целью все обследованные были распределены в 4 группы. В группы М1 (20 мужчин) и Ж1 (56 женщин) вошли лица, не имевшие контакта с ПФ. В группы М2 (38 мужчин) и Ж2 (22 женщины) вошли лица, работавшие в условиях контакта с ПФ. Группы М1 и М2 (Ж1 и Ж2) были сопоставимы по возрасту (Манн-Уитни,  $p = 0,85$  для мужчин,  $p = 0,42$  для женщин).

**Результаты. 1. Влияние условий труда на иммунитет.** При сравнении КС между показателями ИС в группах Ж1 и Ж2 были выявлены 11 случаев инверсии знака КС. В 9 случаях из 11 (81,8%) один из показателей был характеристикой местного иммунитета (IgA-sal (4 раза), s-IgA-sal (5 раз)). Вторыми в этих парах были показатели: lymph abs, CD3 abs, CD4 abs, CD19 abs и lymph%. Во всех указанных случаях отрицательная КС в группе Ж1 изменялась на положительную в группе Ж2. Уровень статистической значимости инверсии знака КС этих пар показателей находился в диапазоне  $0,0002 \leq p \leq 0,038$ . Кроме этого, были обнаружены инверсии знака КС между показателями CD4% и IgG, CD16% и CD19% с  $0,023 \leq p \leq 0,046$ . Все связи были отрицательными в группе Ж1 и положительными в группе Ж2.

При сравнении КС в группах М1 и М2, были обнаружены 5 инверсий знака КС. Четыре инверсии из пяти (80,0%) приходились на КС с показателем IgE ( $0,0009 \leq p \leq 0,0073$ ), одна – на КС с показателями FAGn и CD8% ( $p = 0,031$ ). Другими показателями в парах с IgE во всех случаях были клеточные компоненты иммунитета: leuk, lymph abs, CD16 abs и CD19 abs. Все связи с IgE были отрицательными в группе М1 и положительными в группе М2, связь FAGn – CD8% была положительной в группе М1 и отрицательной в группе М2.

**2. Связь показателей иммунитета, с показателем состояния здоровья ND.** Группы Ж1 и Ж2 были сопоставимы по величине показателя ND (в группе Ж1 медиана ND = 2,5, в группе Ж2 медиана ND = 3,0,  $p = 0,38$ ). В группе Ж1 были выявлены следующие связи: ND –

IgG ( $R = -0,33$ ,  $p = 0,015$ ), IgG – возраст ( $R = -0,29$ ,  $p = 0,035$ ). Связь ND – возраст отсутствовала ( $R = 0,14$ ,  $p = 0,326$ ). После расчета частных корреляций, установлено, что частная корреляция ND – IgG в группе Ж1 статистически значима с  $R_p = -0,30$  и  $p_p = 0,025$  вне зависимости от возраста.

В группе Ж2 были выявлены следующие связи: ND с s-IgA-sal ( $R = 0,44$ ,  $p = 0,039$ ), ND – стаж ПФ ( $R = 0,30$ ,  $p = 0,18$ ), ND – возраст ( $R = 0,41$ ,  $p = 0,057$ ), s-IgA-sal – возраст ( $R = 0,48$ ,  $p = 0,025$ ), стаж ПФ – возраст ( $R = 0,78$ ,  $p < 0,001$ ). Связь s-IgA-sal – стаж ПФ отсутствовала ( $R = 0,28$ ,  $p = 0,22$ ).

Основной результат, полученный в этой группе при расчете частных корреляций, состоял в наличии двух связей: ND – s-IgA-sal с  $R_p = 0,30$  и  $p_p = 0,18$  (не зависели от возраста) и ND – s-IgA-sal с  $R_p = 0,39$  и  $p_p = 0,081$  (не зависела от стажа ПФ). При этом имели место частные корреляции ND – возраст с  $R_p = 0,29$  и  $p_p = 0,195$  и s-IgA-sal – возраст с  $R_p = 0,44$  и  $p_p = 0,048$  (обе не зависели от стажа ПФ), и отсутствовали корреляции со стажем ПФ показателей ND ( $R_p = -0,035$  и  $p_p = 0,88$ ) и s-IgA-sal ( $R_p = -0,17$  и  $p_p = 0,46$ ), не зависящие от возраста.

В группах М1 и М2 имела место тенденция статистически значимого различия по величине показателя ND с  $p = 0,06$  (с медианами ND = 2,0 и ND = 3,0 соответственно).

В группе М1 выявлены следующие связи: ND – IgE ( $R = 0,61$ ,  $p = 0,007$ ), ND – возраст ( $R = 0,54$ ,  $p = 0,019$ ). Связь IgE – возраст ( $R = 0,10$ ,  $p = 0,67$ ) отсутствовала. Показано, что существовала не зависящая от возраста, КС показателя ND с IGE ( $R_p = 0,66$ ,  $p_p = 0,004$ ) и не зависящая от значения IgE КС показателей ND и возраста ( $R_p = 0,61$ ,  $p_p = 0,009$ ).

В группе М2 были выявлены следующие связи: ND – FAGn с  $R = -0,32$  и  $p = 0,048$ ; ND – стаж ПФ с  $R = 0,41$  и  $p = 0,010$ ; FAGn – стаж ПФ с  $R = -0,32$  и  $p = 0,049$ ; ND – возраст с  $R = 0,39$  и  $p = 0,014$ ; стаж ПФ – возраст с  $R = 0,82$  и  $p < 0,001$ . Связь FAGn – возраст отсутствовала ( $R = -0,15$  и  $p = 0,36$ ). После расчета частных корреляций, установлено, что для группы М2 характерно существование двух последовательных звеньев корреляционной цепочки. Первое звено: ND – FAGn при условии независимости от возраста (тенденция с  $R_p = -0,29$  и  $p_p = 0,20$ ). Второе звено: FAGn – стаж ПФ при условии независимости от возраста (значимая связь с  $R_p = -0,35$  и  $p_p = 0,034$ ). При этом прямая связь ND → стаж ПФ при условии

независимости от возраста отсутствовала ( $R_p = 0,17$ ,  $p_p = 0,33$ ).

**Заключение.** Выявлены многочисленные инверсии знаков КС между показателями ИС при сравнении групп мужчин и женщин, работающих в разных производственных условиях. Показано, что прямые КС показателей ND со стажем ПФ отсутствуют, при этом связи ND с показателями ИС, входящими в пары, демонстрирующие феномен инверсии знака КС при изменении условий труда, имеют место во всех рассмотренных нами группах. В группе Ж1 – это показатель IgG, в группе М1 – IgE;

в группе Ж2 – s-IgA-sal, в группе М2 – FAGn. Таким образом, предположение о том, что инверсия знака КС показателей ИС может быть результатом действия ПФ, и эти показатели ИС, чувствительные к ПФ, могут быть связаны с показателем состояния здоровья ND, получила статистическое подтверждение.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. <http://www.proatom.ru/files/demografia.pdf>
2. Т.В. Феофанова, А.И. Мартынов, Т.Г. Федоскова. Труды XII Всероссийского совещания по проблемам управления. ВСПУ-2014 Москва 16–19 июня 2014 г. С.6657-6663.

### THE INFLUENCE OF ENVIRONMENTAL FACTORS ON THE IMMUNE SYSTEM AND THE HEALTH OF THE WORKING POPULATION

Martynov A. I., Feofanova T. V., Fedoskova T. G.

*FSBO SSC Institute of immunology of Federal medical-biological Agency of Russia, Moscow*

The results of the estimation of the association of physical health and immune status of production workers, given their working conditions, are presented. It is shown that physical health is connected with the immune parameters belonging to the correlations that change their signs when two groups with different working conditions are compared.

*Key words:* factor of production, immunity, health of the population.

### МЕХАНИЗМ РАЗВИТИЯ ЭПИКАРДИАЛЬНОГО ЖИРА У КРЫС, ИММУНИЗИРОВАННЫХ НАТИВНЫМИ ЛИПОПРОТЕИНАМИ ВЫСОКОЙ ПЛОТНОСТИ

Фомина К. В., Бедулева Л. В., Аникаева М. А.,  
Столярова Е. Ю., Дипеш С., Меньшиков И. В.

*ФГБОУ ВПО "Удмуртский государственный университет", Ижевск, Россия*

Работа посвящена выяснению механизма развития эпикардиального жира, как маркера атеросклероза. Крыс иммунизировали нативными гетерологичными ЛПВП, исследовали у них продукцию антител к ЛПВП, липидный обмен, уровень андрогенов надпочечников, объем эпикардиального жира, липидный состав надпочечников. Выявлена ассоциация, между ростом уровня антител к ЛПВП, последовательным снижением холестерина плазмы, дегидроэпиандростерон-сульфата и развитием эпикардиального жира. На основе полученных фактов предложена гипотеза, объясняющая механизм развития эпикардиального жира согласно которой развитие иммунной реакции к нативным липопротеинам препятствует полноценной доставке холестерина в кору надпочечников, в результате чего кора надпочечников снижает продукцию андрогенов. Дефицит андрогенов вызывает рост периваскулярной в том числе эпикардиальной жировой ткани, которая, выделяя воспалительные цитокины, индуцирует развитие атеросклеротических изменений в окружающих ее сосудах по механизму «снаружи-внутри».

*Ключевые слова:* экспериментальная модель атеросклероза, эпикардиальный жир, липопротеины высокой плотности, андрогены.

Сегодня не вызывает сомнения, что ключевую роль в развитии атеросклероза играют аутоиммунные реакции. Однако, аутоантигены-мишени, а также роль антител к ним в развитии атеросклероза до конца не ясны. В исследованиях, проведенных нами ранее, было показано, что иммунный ответ у крыс к ЛПНП, вызванный иммунизацией гетерологичными нативными ЛПНП, приводит к развитию признаков, характерных для атеросклероза человека – дислипидемии, изменениям в стенке дуги аорты (инфильтрация лейкоцитами, разрушение интимы, дезорганизация меди), увеличению объема эпикардального жира [1]. Такие же изменения вызывает иммунизация крыс нативными гетерологичными липопротеинами высокой плотности (ЛПВП). Следовательно, к развитию атеросклероза может приводить иммунная реакция к нативным липопротеинам плазмы. Учитывая, что липопротеины доставляют холестерин в ткани, можно предположить, что аутоиммунная реакция к липопротеинам вызывает атеросклероз по причине нарушения снабжения холестерином тканей, зависящих от холестерина плазмы. Для понимания того, как нарушение в снабжении холестерином тканей ведет к развитию атеросклеротических изменений сосудов, основополагающим является факт увеличения объема эпикардального жира при атеросклерозе. У людей увеличение толщины эпикардальной жировой ткани является маркером субклинического атеросклероза и прогностическим показателем его развития. Эпикардальная жировая ткань является белой жировой тканью, окружает коронарные артерии, являясь для них периваскулярной жировой тканью. Показано, что белая жировая ткань, пролиферируя, приобретает провоспалительные свойства и стимулирует атерогенез в сосудистой стенке «снаружи внутрь» [3]. Известно, что увеличение объема жировой ткани может быть вызвано дефицитом андрогенов [2]. Следовательно, можно предположить, что продукция антител к липопротеинам может вести к атеросклеротическим изменениям в стенке сосудов, нарушая доставку холестерина в ткани, синтезирующие андрогены, в частности в клетки надпочечников, что ведет к дефициту андрогенов, который индуцирует пролиферацию периваскулярной белой жировой ткани, вызывающую воспаление в стенке окружаемого ею сосуда.

**Целью настоящей работы** было выяснить, как иммунная реакция к нативным липопротеинам вызывает развитие эпикардального жира у крыс.

Крысы Wistar (n=11) были иммунизированы нативными ЛПВП человека (Kalen Biomedical) в составе неполного адъюванта Фрейнда (Sigma) внутривенно в дозе 200 мкг, однократно. Титр антител против нативных ЛПВП человека, определяли методом иммуноферментного анализа, уровень общего холестерина – ферментативным методом с помощью набора «Холестерин ФС» (Диакон-ДС), холестерин ЛПВП, используя набор «Холестерин ЛПВП» (Human). Для оценки объема эпикардального жира сердце окрашивали на липиды суданом III. Липидный состав надпочечников определяли методом тонкослойной хроматографии липидов с последующим сжиганием фракций с серной кислотой. Уровень дегидроэпиандростерон-сульфата, который является маркером синтеза андрогенов надпочечниками, определяли с помощью набора «Rat DHEA-S Elisa Kit» (MyBioSource).

У всех крыс, иммунизированных нативными ЛПВП, обнаружено увеличение объема эпикардального жира. У контрольных животных эпикардальный жир не обнаруживался. Анализ кинетики антител к ЛПВП у крыс, иммунизированных ЛПВП, показал, что она носит самоподдерживающийся характер. Продукция антител к ЛПВП сопровождается дислипидемией: достоверным снижением уровня общего холестерина (ОХС) и холестерина ЛПВП (ХС-ЛПВП) по сравнению с контрольными животными. Снижение уровня ОХС и ХС-ЛПВП наблюдалось вслед за максимумом продукции антител к ЛПВП. Также у крыс, иммунизированных ЛПВП, выявлено снижение уровня дегидроэпиандростерон-сульфата (ДГЭА-С). Уровень ДГЭА-С в крови, иммунизированных ЛПВП крыс, составил  $40,14 \pm 66,92$  пг/мл, у контрольных крыс  $149,17 \pm 172,52$  пг/мл. Снижение уровня ДГЭА-С в крови следовало за снижением уровня холестерина.

В соответствии с гипотезой исследования мы ожидали выявить снижение уровня холестерина в надпочечниках. Однако различий в уровне холестерина в тканях надпочечников между иммунизированными ЛПВП крысами и контрольными крысами не обнаружено. В то же время у иммунизированных ЛПВП крыс выявлен достоверно низкий уровень

триглицеридов ( $9,89 \pm 3,3\%$ ) по сравнению с контрольными крысами ( $15,65 \pm 7,12\%$ ). Возможно, ткани надпочечников, испытывая дефицит холестерина в условиях снижения ХС-ЛПВП плазмы, который, как известно, у крыс служит основным источником холестерина для синтеза андрогенов в надпочечниках, компенсируют его уровень путем синтеза из ацетата, пул которого в свою очередь пополняется из триглицеридов.

Таким образом, в крови крыс, иммунизированных ЛПВП и развивших эпикардальный жир, за ростом продукции антител к ЛПВП следует снижение уровня ОХС и ХС-ЛПВП, за которым в свою очередь наблюдается снижение уровня ДГЭА-С. Ассоциация, выявленная между ростом уровня антител к ЛПВП, последовательным снижением ОХС, ХС-ЛПВП, ДГЭА-С и развитием эпикардального жира служит доказательством гипотезы, объясняющей причинно-следственные связи между им-

мунным ответом против нативных липопротеинов и увеличением эпикардального жира, а также подтверждает ведущую роль антител к липопротеинам плазмы в развитии атеросклероза.

Исследование выполнено в рамках государственного задания Министерства образования и науки РФ на проведение НИР по теме «Аутоиммунные механизмы атеросклероза. Новая экспериментальная модель атеросклероза у крыс» № 2054.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Beduleva L., Menshikov I., Stolyarova E. et al. / International Journal of Rheumatic Diseases.- 2014.- doi: 10.1111/1756-185X.12335.
2. Mammi C., Calanchini M., Antelmi A. et al. / International Journal of Endocrinology.- 2012.- doi:10.1155/2012/789653
3. Verhagen S.N., Visseren F.L. / Atherosclerosis.- 2011.- Vol. 214.- P. 3-10.

### THE MECHANISM OF DEVELOPMENT EPICARDIAL FAT IN RATS IMMUNIZED NATIVE HIGH DENSITY LIPOPROTEINS

Fomina K. V., Beduleva L. V., Anikaeva M. A., Stolyarova E. Y.,  
Soni D., Menshikov I. V.

*Udmurt State University, Izhevsk, Russia*

The aim of the work is to reveal the mechanism of epicardial fat development, as a marker of atherosclerosis. Rats were immunized with heterologous native HDL. Time course of antibodies to HDL, lipid metabolism, adrenal androgen levels, the amount of epicardial fat were determined. We have found out the association between increasing levels of antibodies to HDL, consistent reduction of plasma cholesterol, dehydroepiandrosterone – sulfate, and the development of epicardial fat. Based on the facts we have proposed to the hypothesis to explain the mechanism of epicardial fat development according to which the immune response to native lipoproteins prevents delivery of the cholesterol to the cortex of the adrenal gland, resulting in adrenal cortex reduces androgen production. Androgen deficiency causes an increase in perivascular including epicardial adipose tissue, which releases inflammatory cytokines and induces the development of atherosclerotic lesions in the surrounding vessels «outside to inside».

*Keywords:* experimental model of atherosclerosis, epicardial fat, high-density lipoproteins, androgens.

## ВЛИЯНИЕ ДЕКСАМЕТАЗОНА НА ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ И ПРОЛИФЕРАТИВНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ НАИВНЫХ Т-ЛИМФОЦИТОВ

Хазиахматова О. Г., Сохоневич Н. А., Юрова К. А.,  
Литвинова Л. С.

Инновационный парк, Балтийский федеральный университет  
им. Иммануила Канта, Калининград, Россия

Проведенное *in vitro* исследование позволило выявить эффекты дексаметазона на дифференцировку и пролиферативный потенциал наивных Т-клеток, ассоциированные с транскрипцией мРНК генов *U2af114*, *Gfi1* и *hTERT* и изменением содержания числа CD28<sup>+</sup> и дубль-позитивных (CD45RA<sup>+</sup>/RO<sup>+</sup>) Т-клеток. Дексаметазон, повышая уровень экспрессии генов – *Gfi1* и *U2af114*, способствует росту числа переходных форм Т-лимфоцитов и снижению содержания CD28<sup>+</sup> Т-клеток. В целом, дексаметазон оказывает супрессивный эффект на экспрессию гена *hTERT*, который снижается с увеличением концентрации гормона, восстанавливая пролиферативный потенциал клеток.

Ключевые слова: Т-лимфоциты, *U2af114*, *Gfi1*, *CD28*, *hTERT*.

**Актуальность и цель работы.** Эффективность иммунного ответа на антигены различной природы определяется селективной экспансией и дифференцировкой клонов антиген-специфических Т-клеток. Установлено, что процессы активации, созревания и дифференцировки наивных Т-клеток фенотипически сопровождаются потерей экспрессии поверхностных костимуляторных молекул – CD27 и CD28 [1], а также появлением коротких изоформ рецептора CD45 – CD45RO, вместо высокомолекулярных – CD45RA. Изоформы молекулы CD45 формируются благодаря альтернативному сплайсингу гена *Ptprc*, кодирующего трансмембранную тирозинфосфатазу (CD45) [2; 3]. Предполагают, что один из механизмов, регулирующих альтернативный сплайсинг гена *Ptprc*, основан на противоположном действии факторов: сплайсинга *U2af114* (*U2 small nuclear RNA auxiliary factor 1-like 4*, *U2af114*) и транскрипции *Gfi1* (*growth factor independent 1*) [2]. Глюкокортикоиды являются мощными иммуносупрессивными и противовоспалительными агентами, которые оказывают плеiotропное действие на рост, дифференцировку и функциональную активность лимфоцитов [4]. Мы предполагаем, что одним из механизмов, посредством которого глюкокортикоиды принимают непосредственное участие в диффе-

ренцировке Т-клеток, может быть регуляция альтернативного сплайсинга гена *Ptprc*.

**Материалы и методы.** Материалом исследования служила венозная кровь 58 здоровых доноров. Популяцию наивных (CD3<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>) Т-лимфоцитов получали из взвеси мононуклеаров методом иммуномагнитной сепарации (MidiMACS Separator, LS Columns, Miltenyi Biotec, Германия). Клетки инкубировали 48 часов при 37 °С и 5% CO<sub>2</sub> в бессывороточной среде Искова с добавлением клеточного активатора и разных концентраций дексаметазона. В качестве активатора Т-лимфоцитов использовали реагент T-Cell Activation/Expansion Kit human (Ac/Exp) («Miltenyi Biotec», Германия). В эксперименте были использованы следующие варианты культивирования: интактная проба; проба с добавлением Ac/Exp; пробы с Ac/Exp и Dex (10<sup>-7</sup>, 10<sup>-6</sup>, 10<sup>-5</sup> М). Исследование количества Т-лимфоцитов, экспрессирующих молекулы – CD3, CD28, CD45RO, CD45RA в CD45RA<sup>+</sup>-культурах, проводили методом проточной цитометрии с помощью МКАТ, конъюгированных с FITC, PE и APC («e-Bioscience», США), на приборе «MACSQuantAnalyzer» («Miltenyi Biotec», Германия). Тотальная РНК из клеточных культур была выделена с использованием реагентов ExtractRNA Kit («Евроген», Россия); степень очистки РНК определяли

по соотношению A260/280. Выделенная РНК была использована в реакции обратной транскрипции с применением реагентов MMLV Kit («Евроген», Россия). Для затравки использовали oligo (dT) 23-primer в концентрации 20 мкМ. Динамику изменений экспрессии генов *Gfi1* и *U2af114* оценивали с помощью ПЦР с использованием реагентов qPCRmixHS («Евроген», Россия), и праймеров в концентрации 10 пМ. В качестве референсных генов использовали ген *GAPDH* и *RPLPO*. Использовали следующие олигонуклеотидные праймеры:

*GFI1\_for* 5'-TGGAGCAGCACAAAGCC-3';  
*GFI1\_rev* 5'-GACAGTGTGGATGACCTCTTG-3';  
*U2af114\_for* 5'-CTTCACAACAAGCCGACATTC-3';  
*U2af114\_rev* 5'-CAAGGTGTGCGCACACATTC-3';  
*GAPDH\_for* 5'-GAAGGTGAAGGTTCGGAGTC-3';  
*GAPDH\_rev* 5'-GAAGATGGTGTGATGGGATTTTC-3';  
*TERT\_for* 5'-TGACACCTCACCTCACCCAC-3';  
*TERT\_rev* 5'-CACTGTCTTCCGCAAGTTCAC-3';  
*RPLPO\_for* 5'-GGCGACCTGGAAGTCCAAC-3';  
*RPLPO\_rev* 5'-CCATCAGCACCACAGCCTTC-3';  
зонды: *GFI1\_probe* FAM-5'-CGCAGGAACGGAGCTTTGACTGTA-3'~BHQ-1; *U2af114\_probe* FAM-5'-CCAGGAGGTGTTACAGAACTGCA-3'~BHQ-1; *GAPDH\_probe* HEX-5'-CAAGCTTCCGTTCTCAGCC-3'~BHQ-1; *TERT\_probe* FAM-5'-ACCCTGGTCCGAGGTGTCCCTGAG-3'~BHQ-1; *RPLPO\_probe* HEX-5'-ATCTGCTGCACTGCTTGGAGCCCA-3'~BHQ-1.

RT-PCR проводилась в трех повторах с применением LightCycler 480 Real-Time PCR («Roche», Швейцария) в температурном режиме: 95 °C – 5 мин; 95 °C – 20 с, 60 °C – 30 с, 72 °C – 1 мин – 45 циклов; 72 °C – 5 минут. Расчеты уровней относительной экспрессии исследуемых генов производили с помощью модифицированной формулы Пфаффа. Полученные результаты были проанализированы с использованием пакета статистических программ SPSS\_20.

**Результаты.** Сплайсинг транскриптов, кодирующих молекулу CD45, значительно изменяется в ответ на активацию Т-клеток [5]. Так, добавление активатора в культуры наивных (CD45RA<sup>+</sup>) Т-клеток, наряду с увеличением числа мертвых клеток и усилением их пролиферации, сопровождалось выраженным угнетением экспрессии мРНК обоих генов: *U2af114* и *Gfi1*, тогда как экспрессия гена *hTERT* резко возросла (в 68,6 раза) по сравнению с интактной пробой. Выявленные изменения сопровождалось снижением содержания CD28<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, и напротив, увеличением числа дубль-позитивных Т-клеток

(CD45RA<sup>+</sup>/RO<sup>+</sup>), что может свидетельствовать об антиген-независимой дифференцировке наивных Т-лимфоцитов в клетки эффекторной и/или центральной памяти. Добавление Dex в среду культивирования TCR-активированных CD45RA<sup>+</sup> Т-клеток позволило выявить прямой дозозависимый эффект этого гормона на экспрессию мРНК генов *U2af114* и *Gfi1*. Увеличение числа дубль-позитивных (CD45RA<sup>+</sup>/RO<sup>+</sup>) Т-клеток (до 49,33±6,40%) в пробе с Dex (10<sup>-5</sup> М) имело положительную корреляцию с экспрессией гена *U2af114* ( $r=0,87$ ,  $p<0,05$ ). Как уже упоминалось, антагонистические взаимодействия *U2af114* и *U2af114* определяют соотношение изоформ CD45: *U2af114* способствует исключению 4 экзона, что приводит к формированию коротких изоформ – CD45RO, тогда как *Gfi1* ассоциирован с образованием более активной, высокомолекулярной формы рецептора – CD45RB или RA [2]. Интересно, что увеличение концентрации Dex (10<sup>-5</sup> М) в среде культивирования TCR-активированных наивных Т-клеток, в целом, сопровождалось повышением уровня экспрессии мРНК гена *hTERT*, и было ассоциировано с увеличением числа CD28-негативных лимфоцитов и переходных форм – CD45RA<sup>+</sup>/RO<sup>+</sup> Т-клеток. По всей видимости, снижение супрессивного эффекта дексаметазона на экспрессию *hTERT* может быть связано с ростом числа устойчивых, коротких изоформ – CD45RO<sup>+</sup> Т-клеток в культуре.

Выявленные нами изменения могут свидетельствовать о глюкокортикоид-опосредованном созревании и дифференцировке TCR-активированных наивных (CD45RA<sup>+</sup>) Т-лимфоцитов с сохранением их репликативного потенциала.

Работа выполнена в рамках стипендии Президента РФ (СП-454.2013.4) и субсидии на выполнение государственной работы «Организация проведения научных исследований» (№ 603).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кудрявцев И. В. Российский иммунологический журнал 2014, 8 (4), 947-964.
2. Heyd F, ten Dam G., Möry T. Nat Immunol 2006, 8, 859-867.
3. Litvinova L. S., Mazunin I. O., Gutsol A. A. et. al. Molecular Biology 2013, 47 (4), 572-580.
4. Фатхуллина А. Р., Абрамов С. Н., Скибо Ю. В., Абрамова З. И. Цитология 2014, 56 (6), 459-461.
5. Butte M. J., Lee S. J., Jesneck J. et al. Plos One 2012. <http://dash.harvard.edu/bitstream/handle/1/10436326/3386953.pdf?sequence=1>

## INFLUENCE OF DEXAMETHASONE ON THE PROLIFERATIVE POTENTIAL AND DIFFERENTIATION OF NAIVE T-LYMPHOCYTES

Khaziakhmatova O. G., Sokhonevich N. A., Yurova K. A., Litvinova L. S.

*Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russia*

Conducted *in vitro* study revealed dexamethasone effects on the differentiation and proliferation potential of naive T-cells associated with the transcription of mRNA gene *U2af114*, *Gfi1* and *hTERT* and changing the number CD28<sup>+</sup> and double-positive (CD45RA<sup>+</sup>/RO<sup>+</sup>) T cells. Dexamethasone increases the level of gene expression – *Gfi1* and *U2af114*, increases the number of transitional forms of T-lymphocytes and reduces the content of CD28<sup>+</sup> T cells. In general, the dexamethasone has a suppressive effect on gene expression *hTERT*, which decreases with increasing concentrations of hormone, restoring the proliferative potential of cells.

---

---

## ВЛИЯНИЕ АНТИГЕННОЙ НАГРУЗКИ НА МИКРОСОМАЛЬНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ПЕЧЕНИ У КРЫС С РАЗЛИЧНОЙ УСТОЙЧИВОСТЬЮ К ГИПОКСИИ

Цейликман В. Э.<sup>1</sup>, Комелькова М. В.<sup>1</sup>, Цейликман О. Б.<sup>2</sup>,  
Кузина О. В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ГБОУ ВПО «Южно-Уральский государственный медицинский университет  
Минздрава России»; <sup>2</sup>ГБОУ ВПО «Южно-Уральский государственный университет»,  
Челябинск, Россия

Установлено, что эффекты антигенной нагрузки на микросомальное окисление связаны с устойчивостью к гипоксии. Среди исследованных показателей микросомального окисления печени, наиболее зависимой от устойчивости к гипоксии оказалась активность НАДФН цитохром P450-редуктазы.

*Ключевые слова:* антигенная нагрузка, микросомальное окисление, НАДФН цитохром P450 редуктаза.

Введенный впервые Е. А. Корневой термин «иммунофизиология» позволил сфокусировать внимание исследователей на значении медиаторов иммунной системы в регуляции физиологических функций [3]. С этих позиций дано объяснение феномену повышенной устойчивости к гипоксии при воздействии иммуностимуляторов или алоантигенов. В свою очередь повышенная устойчивость к гипоксии ассоциирована со сниженным уровнем микросомального окисления [1]. Эту закономерность особенно наглядно характеризуют исследования связанные с фенотипированием животных на высокоустойчивых (ВУ) и низкоустойчивых (НУ) крыс [1]. С точки зрения иммунофизиологии реципрокные отношения

между устойчивостью к гипоксии и уровнем микросомального окисления могут быть связаны с регуляторным действием секретлируемых иммунокомпетентными клетками цитокинов. Известно, что провоспалительные цитокины характеризуются способностью угнетать активность цитохром P450 зависимых монооксигеназ [2;4]. Однако остается неизвестным характер влияния иммунизации животных на состояние микросомального окисления у крыс с различной устойчивостью к гипоксии. Настоящее исследование посвящено решению этого вопроса.

**Методика.** Исследование было выполнено на 54 белых беспородных крысах разделенных на следующие группы:

1. Интактные животные (n=10)
2. ВУ животные (n=12)
3. НУ животные (n=12)
4. Иммунизированные ВУ животные (n=10)
5. Иммунизированные НУ животные (n=10)

Гипоксическая гипоксия моделировалась при помощи барокамеры. Создаваемое в барокамере разрежение воздуха соответствовало «подъему на высоту» 11500 м над уровнем моря. Для определения возможности распределения крыс на фенотипические группы ВУ и НУ животных был проведен двухэтапный кластерный анализ с автоматическим определением числа кластеров. Для иммунизации крыс использовали эритроциты барана исходя из присутствия в них тимусзависимого антигена. У животных через 24 часа после разрешающей иммунизации антигена определялись выраженность реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ), количество антителообразующих клеток АОК, содержание цитохромов b5 и P450 и активность НАДФН-цитохром P450 редуктазы в микросомах печени.

**Результаты и обсуждение.** Вопреки представлениям о супрессивном действии медиаторов иммунной системы на микросомальное окисление у ВУ животных иммунизация не сопровождалась снижением уровня цитохрома P450. А содержание цитохрома b5 было статистически значимо повышено с  $0.484 \pm 0.07$  мкмоль/мг.белка (n=12) до  $1.354 \pm 0.25$  мкмоль/мг.белка (n=10;  $p=0.041U$ ). У НУ крыс иммунизация сопровождалась более выраженным усилением микросомального окисления чем у ВУ крыс. Это проявлялось в повышении содержания цитохрома P450 с  $419.62 \pm 10.45$  нмоль/мг.белка (n=12) до  $895.16 \pm 37.62$  нмоль/мг.белка (n=10;  $p=0.041U$ ). Кроме того у иммунизированных НУ животных также как и у ВУ животных при иммунизации был повышен уровень цитохрома b5 с  $0.308 \pm 0.06$  мкмоль/мг.белка (n=12) до  $1.31 \pm 0.14$  мкмоль/мг.белка (n=10;  $p=0.021U$ ).

В условиях антигенной нагрузки среди исследованных показателей микросомального окисления печени, наиболее зависимой от устойчивости к гипоксии оказалась активность НАДФН цитохромP450-редуктазы. Это проявлялось в сниженном уровне ее активности у ВУ животных ( $21.09 \pm 2.32$  нмоль/мин/мг; n=10) по сравнению с НУ животными ( $46.41 \pm 4.78$  нмоль/мин/мг; n=10;  $p=0.034U$ ).

Важно отметить, что гипоксическое воздействие у неиммунизированных животных привело к увеличению активности этого фермента вне зависимости от устойчивости к гипоксии. Так у ВУ крыс пребывание на высоте 11500 м привело к шестикратному повышению уровня активности НАДФН цитохромP450-редуктазы (интактные животные:  $3.07 \pm 0.45$  нмоль/мин/мг; n=10; ВУ животные  $20.53 \pm 2.37$  нмоль/мин/мг; n=10;  $p=0.011U$ ). Аналогично у НУ животных острая гипоксия сопровождалась повышением НАДФН цитохромP450-редуктазы с  $3.07 \pm 0.45$  нмоль/мин/мг (n=10) до  $18.54 \pm 1.07$  нмоль/мин/мг; (n=10;  $p=0.011U$ ). Иммунизация у НУ животных привело к дальнейшему повышению активности НАДФН цитохромP450-редуктазы с  $18.54 \pm 1.07$  нмоль/мин/мг (n=10) до  $46.41 \pm 4.78$  нмоль/мин/мг (n=10). Между тем, у ВУ животных иммунизация не сопровождалась дальнейшим ростом активности этих ферментов.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что среди исследованных показателей микросомального окисления наиболее чувствительным к острой гипоксии является НАДФН цитохромP450-редуктаза. Это хорошо согласуется с данным других исследователей о совместной активации этого фермента и индукции эритропоэтина [5]. Важно отметить, что иммунизации уровень ретикулоцитов повысился у НУ животных ( $p=0.03U$ ), а у ВУ животных не претерпел статистически значимых изменений. Таким образом, наши данные демонстрируют однонаправленные изменения уровня эритропоэза и активности НАДФН цитохромP450-редуктазы. Данное положение иллюстрируется положительной корреляционной связью между количеством ретикулоцитов и уровнем активности НАДФН цитохромP450-редуктазы ( $R_s=0.689$ ;  $p=0.032$ ). Между эритропоэзом и лимфопоэзом в костном мозге возможны реципрокные отношения, обусловленные выбором дифференцировки стволовых кроветворных клеток. В связи с этим представляются интересными обнаруженные нами отрицательной корреляции между количеством ретикулоцитов и содержанием лимфоидных клеток в костном мозге ( $R_s=-0.732$ ;  $p=0.024$ ). Аналогичная корреляционная связь обнаружена между уровнем активности НАДФН цитохром P450-редуктазой и количеством лимфоидных клеток в костном мозге ( $R_s=-0.614$ ;  $p=0.044$ ).



Таким образом полученные нами результаты не выявили супрессию микросомального окисления в условиях иммуностимуляции, что согласуется с представлениями С. В. Сибирияка и соавторов [4] о вкладе цитохром Р450- зависимых монооксигеназ в формировании иммунного ответа за счет их участия в метаболизме липофильных эндобиотиков. В частности, изоформы семейства СУРЗА участвуют в инактивации глюкокортикоидов в печени. Вполне возможно, что высокий уровень экспрессии этих изоформ ограничивает иммуносупрессивное действие глюкокортикоидов. Кроме того, изоформы цитохрома Р450 присутствуют в иммунокомпетентных клетках, где они вовлекаются в метаболические процессы и вносят свой вклад в поддержании их функциональной активности. В тоже время у НУ животных активация микросомальных ферментов выражена в гораздо большей степени чем у ВУ животных, причем это положение в наибольшей степени касается НАДФН цитохромР450-редуктазы. Это становится объяснимым в случае ее коэкспрессии с эритропоэтином. Возможно, у НУ животных большая чем у ВУ животных потребность в кислороде, что приводит к напряжению кислород-транспортных систем и влечет за собой повышенный уровень эритропоэтина. Сце-

пленное с эритропоэзом увеличение активности НАДФН цитохромР450-редуктазы может благоприятствовать развитию оксидативного стресса, который играет ключевую роль в развитии повреждений органов и тканей гипоксического характера.

Исследование поддержано грантом РФФИ 14-04-01381 и базовой частью Госзадания Министерства образования и науки РФ (код проекта 1696)

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Грек О.Р. Гипобарическая гипоксия и метаболизм ксенобиотиков. / О.Р. Грек, А.Е. Ефремов., В.И. Шарапов //М.,2007, 187 с.
2. Ковалев И.Е. Иммунохимическая функциональная система гомеостаза при инфекционной и неинфекционной патологии / И.Е. Ковалёв, Э.Ю. Мусабаев, М.Д. Ахмедова. – Ташкент, 1994. – 196 с.
3. Корнева Е.А. О взаимодействии нервной и иммунной систем / Е. А. Корнева // Иммунофизиология / под ред. Е. А. Корневой. – СПб., 1993. – С. 7–9.
4. Сибирияк С.В. Цитокиновая регуляция биотрансформации ксенобиотиков и эндогенных соединений / С.В. Сибирияк, В.А. Черешнев, А.С. Симбирцев и др. – Екатеринбург: Изд-во УрО РАН, 2006. – 162 с.
5. Oguro A. Koyama C. Xu J., Imaoka S. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014, 28; Vol. 445 (1): 43-47.

### INFLUENCE OF ANTIGEN LOAD ON THE LIVER MICROSOMAL OXIDATION IN RATS WITH DIFFERENT RESISTANCE TO HYPOXIA

Tseilikman V. E.<sup>1</sup>, Komelkova M. V.<sup>1</sup>, Tseilikman O. B.<sup>2</sup>, Kusina O. V.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>South Ural State Medical University; <sup>2</sup>South Ural State University,  
Chelyabinsk, Russia

It is found that the effects of antigen load on microsomal oxidation associated with resistance to hypoxia. Among the studied parameters of liver microsomal oxidation, the most dependent on resistance to hypoxia were active of NADPH-Cytochrome P450 reductase.

*Key words:* antigen load, microsomal oxidation, NADPH-Cytochrome P450 reductase.

## МИОЗИТ С ВКЛЮЧЕНИЯМИ ТЕЛЕЦ: МЕХАНИЗМ ИММУННОГО ВОСПАЛЕНИЯ И ПРОБЛЕМЫ ИММУНОТЕРАПИИ

Цигулева О. А., Восканян Л. Р.

ГОУ ВПО Алтайский государственный медицинский университет, Барнаул, Россия

Опробованы многочисленные варианты терапии такого аутоиммунного заболевания, как миозит с включениями телец. Применялись глюкокортикоиды, концентрированные иммуноглобулины, «тестостерон-депо», цитопротективная терапия, цитостатики, фактор некроза опухоли и др. Наилучший результат достигнут при лечении инфликсимабом, однако улучшение продолжается не более года. В настоящее время обсуждается возможность лечения МТ, с использованием микроРНК.

*Ключевые слова:* миозит, В-амилоид, аутоиммунное воспаление, аномальное старение, иммунотерапия

Миозит с включениями телец (МТ) – прогрессирующее заболевание с нарушением структуры синтеза и утилизации белков. Болезнь протекает на основе аутоиммунного процесса [1]. Этиология и патогенез МТ до конца не изучены. Достоверно известно, что чаще болеют мужчины, важную роль играет наследственность, пожилой возраст, дефицит витаминов, селена. Наши представления об МТ базируются на трех механизмах: формирование третичной структуры вновь синтезированных белков, нарушения в системе утилизации этих белков и активации процессов аутоагрессии со стороны иммунной системы. Накопление радикальных метаболитов индуцирует возникновение агрегатов, таких как В-амилоид. Накопление в динамике заболевания глутатион-пероксидазы и тау-протеина ведет к аутоиммунному воспалению. Из продуктов расщепления под влиянием избытка ферментов накапливается В-амилоид, он и формирует «нейрофибрилярные клубочки» или «аксональные бляшки» внутри мышечных волокон при МТ. Избыточное количество В-амилоида при МТ стимулирует усиленное фосфорилирование, приводящее к образованию тау-протеина. Протеин-тау способен «путать» мышечные волокна, превращая прямые – в спиральные. При МТ тау-протеин цитотоксичен и связан в мышцах с микротубулярной сетью. Аутоиммунное воспаление при МТ развивается путем накопления аутоагрессивных клонов CD8<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup> и макрофагов, но поиски конкретного антигена до сих пор не привели к успеху [2].

Целью нашей работы было изучение иммунновоспалительных механизмов при МТ, поиск экзогенных факторов, ведущих к ускорению процесса развития МТ (в том числе лекарств) и анализ, практикующихся в настоящее время методов терапии МТ.

Для изучения отобрана группа пациентов (17 человек): 10 мужчин и 7 женщин с МТ, все старше 60 лет (64±4,0 года). Клиническая картина МТ включала: мышечную слабость конечностей, затруднение при ходьбе, частые падения, слабость дыхательной мускулатуры, реже дисфагию. В анамнезе у пациентов МТ отмечен длительный прием препаратов: амиодарона и др., которые могли сыграть роль повреждающих факторов [3, 4]. При обследовании пациентов с МТ определялся В-амилоид в мышцах методом иммунопреципитации. Проводилась биопсия мышцы, а затем электронная микроскопия биоптата мышечного фрагмента, с последующей тиофлавин-флюоресценцией. Изучался ряд иммунологических тестов: антинуклеарные антитела (АНА), антинуклеарный фактор (АНФ), моноклональные антитела SMI-31 к тау-протеинам. Проводилась электромиография и цереброспинальная пункция, с изучением пункта. При электронной микроскопии мышечного биоптата определялись В-амилоид и вакуоли. При анализе иммунных сдвигов определялись высокие титры АНФ, АНА к волокнам миелина, моноклональные антитела SMI-31 к тау-протеинам в сыворотке крови. При электромиографии (ЭМГ) выявлены фибрилляции, характерные для денервации мышечных воло-

кон, снижение скорости распространения нейрофизиологического возбуждения. Средний показатель скорости распространения возбуждения по большеберцовому нерву –  $24,9 \pm 6,2$  м/с (норма 40 м/с). Амплитуда мышечного ответа в том же нерве составила –  $1,4 \pm 1,2$  мВ (норма 3,5 мВ). По икроножным нервам распространение возбуждения отсутствовало (норма 30 м/с). При цереброспинальной пункции в пунктате обнаружены моноклональные антитела к ганглиозиду SMI-31 и высокий титр иммунных комплексов. Для подтверждения оксидативного стресса использовалось обнаружение избытка ферментов: глутатион-пероксидазы и глутатион-дисмутазы. У 90% уровень фермента в 1,5–2 раза превышал норму. Проведенное лечение показало, что большинство пациентов (15 из 17) оказалось резистентно к терапии преднизолоном и другими глюкокортикоидами. Улучшение наступало на короткий период и характеризовалось исчезновением дисфагии. У 13 пациентов использованы концентрированные иммуноглобулины (пентаглобин) для внутривенного введения. После 10 инъекций по ЭМГ отмечено снижение димиелинизирующих процессов, ускорение распространения возбуждения по нервам конечностей. Однако улучшение продолжалось не более 3–4 месяцев. У мужчин опробован курс «тестостерон-депо» терапии. На фоне еженедельного введения тестостерона-депо, в дозе 100 мг отмечалось уменьшение двигательных расстройств, уменьшение толерантности к двигательным нагрузкам. Дозу тестостерона приходилось увеличивать до 200 мг в неделю, при этом лечение начинало вызывать токсические эффекты и отменялось. С целью цитопротекции вводился L-каротин по 900 мг 4 раза в сутки, Co-Q10 по 100 мг 4 раза в сутки, витамины B1 – 100 мг, B2 – 100 мг, B6 – 100 мг, E – 1000 мг 3 раза в сутки. Это улучшало память, сон и снижало мышечное воспаление на период в 2–3 месяца (после месяца терапии). Авто-

ры курса цитопротекции [5] предполагали, что таким образом удастся за счет Co-Q10 приостановить повреждение мышечных волокон и формирование «аксональных бляшек». Иммуносупрессивная терапия: циклофосфан, метотрексат, азотиоприн в средних терапевтических дозах вообще не давала положительного эффекта. У небольшого числа больных (3 пациента) использован фактор некроза опухоли: инфликсимаб, что приводило к значительному улучшению, но требовало длительной (12 месяцев) терапии и было очень нагрузочным с экономической точки зрения. Под влиянием инфликсимаба наблюдалось увеличение мышечной силы, исчезновение других синдромов МТ. К сожалению, эффект сохранялся не более года.

**Выводы:** внутримышечные включения при МТ связаны с аутоиммунными процессами, развивающимися в период старения. Но это старение идет патологическим путем. Эффективные методы лечения, такие как инфликсимаб, концентрированные иммуноглобулины, цитопротекторы дороги и недоступны для большинства пациентов. В настоящее время обсуждается возможность лечения МТ, с использованием микроРНК. Такая терапия представляет собой регуляторные молекулы из 18-24 нуклеотидов, влияющих на рост и дифференцировку миоцитов. Действие микроРНК заключается в предотвращении дегенерации мышечных волокон.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аверьянов Ю.Н., Яхно Н.Н., Нечкина Н.П. // Журн. неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова, 1992. – 3: 33-41.
2. Костина Н.С. Автореф. дис... канд. мед. наук. – Саратов, 2002.
3. Голубев Л.В., Сухачева О.В., Бойко А.Н. // Неврологический журн., – 2004. – 1: 51-57.
4. Михайлова Н.М., Соколова О.Н. // Журн. неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова, 2004. – 10: 41-46.
5. Griggs R.S. // Neurology. – 2006. – Vol. 66, № 2, suppl. 1. – p. 30-32.

### MYOSITIS WITH INCLUSION BODIES: MECHANISMS OF IMMUNE INFLAMMATION AND IMMUNOTHERAPY

Tsiguleva O.A., Voskanyn L.R.

*Altai State Medical University, Barnaul, Russia*

Tested numerous treatment options myositis with inclusion bodies. Applied corticosteroids, concentrated immunoglobulins, "Testosterone depot", cytoprotective therapy, cytotoxic agents, tumor necrosis factor and others. The best result was achieved with infliximab, but the improvement is not continued more than a year. Currently, we discuss the possibility of treatment MT, using microRNAs.

*Keywords:* myositis, amyloid B, autoimmune inflammation, abnormal aging immunotherapy.

## ИЗМЕНЕНИЯ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ЛЮМИНОЛЗАВИСИМОЙ ХЕМИЛЮМИНИСЦЕНЦИИ У ЦЫПЛЯТ-БРОЙЛЕРОВ В УСЛОВИЯХ КРУПНОЙ ПТИЦЕФАБРИКИ

Шавшукова О. А.<sup>1</sup>, Хлызова Л. А.<sup>1</sup>, Шилов Ю. И.<sup>2,1</sup>, Шилов С. Ю.<sup>2,1</sup>,  
Виноградов А. Б.<sup>1</sup>, Четвертных В. А.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ГБОУ ВПО «Пермский государственный медицинский университет имени академика Е. А. Вагнера» Минздрава России; <sup>2</sup>ФГБУН Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь, Россия

Установлено, что у части 14- и 28-суточных цыплят-бройлеров кросса «ROSS-308» при промышленном содержании развивается выраженный иммунодефицит с гиперактивацией фагоцитирующих клеток со значительным увеличением продукции активных форм кислорода в ответ не только на опсонизированный, но и на неопсонизированный зимозан с последующим появлением анергии ответа лейкоцитов на зимозан.

**Ключевые слова:** цыплята-бройлеры, фагоциты, люминолзависимая хемилюминесценция, микрофлора.

**Актуальность.** Фагоцитирующие клетки кур характеризуются целым рядом отличий от фагоцитов млекопитающих и человека [1]. В частности, в гетерофилах периферической крови отсутствует миелопероксидаза, в связи с чем в кислородзависимых механизмах микробицидности не участвуют активные формы галогенов [2]. При промышленном содержании животные подвержены стрессорным воздействиям, что может приводить к модуляции реакций врожденного и приобретенного иммунитета и к снижению резистентности к собственной микрофлоре [3]. Однако изменения функций отдельных звеньев иммунной системы в раннем постнатальном онтогенезе птиц при их выращивании на крупных птицефабриках изучены недостаточно.

**Цель работы** – исследование изменений показателей люминолзависимой хемилюминесценции лейкоцитов крови, грудно-брюшной полости и бронхо-альвеолярного лаважа цыплят-бройлеров в условиях крупной птицефабрики.

**Материалы и методы.** Исследования проводили на 40 цыплятах-бройлерах кросса «ROSS-308» в возрасте 14 и 28 суток, выращиваемых на птицефабрике «Пермская» (ПФ) Пермского края. Животных разделили на две группы: контроль – здоровые цыплята без клинических признаков заболевания и высева микро-

организмов из внутренних органов (1-я группа); ослабленные птицы с массивным высевом микроорганизмов в форме ассоциаций *E. coli*, *Streptococcus spp.*, *Proteus spp.*, *Enterococcus spp.* из внутренних органов (сплошной рост колоний) (2-я группа). Контаминацию органов микроорганизмами выявляли общепринятыми микробиологическими методами. Цыплята содержались в одинаковых условиях; всем проводилась утвержденная на предприятии схема лечебно-профилактических мероприятий. Кровь и внутренние органы для исследований забирали в условиях ветеринарного блока ПФ согласно производственного регламента.

Лейкоциты крови (50 ЕД гепарина/мл крови) выделяли методом седиментации с 0,1% метилцеллюлозой (Sigma-Aldrich, США). Плевро-перитонеальные лейкоциты и клетки бронхоальвеолярного лаважа выделяли методом промывания соответственно грудно-брюшной полости и бронхолегочного комплекса 10 мл среды 199 с добавлением 10 ЕД/мл гепарина, 2 мМ L-глутамин и 10 мМ НЕРЕС (Sigma-Aldrich, США). После двукратного отмывания центрифугированием при 400 g в течение 10 мин клетки ресуспендировали в растворе Хенкса без фенолового красного с добавлением 10 мМ НЕРЕС и доводили их концентрацию до  $25 \times 10^6$  клеток/мл. Кислородзависимую микробицидность клеток оценивали методом

люминолзависимой хемилюминесценции. В стимулированном варианте в лунке планшета (3915 Assay Plate 96 Well Flat bottom Black Polyesterene, Corning Inc. Costar) смешивали 70 мкл раствора Хенкса с добавлением 10 мМ HEPES, 10 мкл натриевой соли люминола на растворе Хенкса без фенолового красного (конечная концентрация  $10^{-4}$  М), 10 мкл лейкоцитов ( $25 \times 10^6$ /мл) и 10 мкл опсонизированного и неопсонизированного зимозана (Zymosan A, Fluka BioChemika, конечные концентрации 1500 и 150 мкг/мл). В спонтанном варианте смешивали те же компоненты, но вместо зимозана вносили 10 мкл забуференного 10 мМ HEPES раствора Хенкса. Измерение проводили при температуре  $+42^\circ\text{C}$ , характерной для кур, на люминометре Luminoskan Ascent® Thermo LabSystems в течение 180 мин (тип измерения – kinetic, integration time – 1000 ms, интервал – 3 мин, meas. count – 60). Для статистического анализа использовали интегральный показатель хемилюминесценции за весь период измерения (integral, RLU). Опсонизацию зимозана проводили пулом свежей сыворотки от 20 кур в течение 30 мин при температуре  $+42^\circ\text{C}$ . После двукратного отмывания опсонизированного зимозана центрифугированием при 400 g в течение 10 мин, его концентрацию доводили до 15 мг/мл, суспензию замораживали при  $-26^\circ\text{C}$  в микропробирках Эппендорф по 100 мкл до использования.

**Результаты и обсуждение.** Установлено, что у 14-суточных цыплят 2-й группы в сравнении с 1-й наблюдается выраженное увеличение числа плевро-перитонеальных лейкоцитов (с  $29,20 \pm 3,32$  в 1-й группе до  $60,20 \pm 5,25$  млн. клеток во 2-й;  $p < 0,0001$ ). Выявлено увеличение интегральных показателей как спонтанной, так и индуцированной опсонизированным и неопсонизированным зимозаном в концентрациях 1500 и 150 мкг/мл реакции люминолзависимой хемилюминесценции (ЛЗХЛ) с плевро-перитонеальными лейкоцитами у животных 2-й группы в сравнении с 1-й ( $p < 0,002-0,0001$ ). Важная особенность ответа плевро-перитонеальных лейкоцитов у здоровых цыплят этого возраста – отсутствие статистически значимого ответа на неопсонизированный зимозан в сравнении с показателями спонтанной ЛЗХЛ при наличии дозо-зависимой реакции на опсонизированный зимозан. У 14-суточных птиц 2-й группы ответ в сравнении с показателями нести-

мулированных проб развивается не только на опсонизированный, но и на неопсонизированный зимозан в концентрации 1500 мкг/мл ( $p < 0,005-0,0001$ ). Подобные изменения с учетом увеличения общего количества плевро-перитонеальных лейкоцитов у животных 2-й группы в сравнении с 1-й могут быть связаны с усилением миграции из кровеносного русла активированных фагоцитирующих клеток с повышенной функциональной экспрессией паттерн-распознающих рецепторов, взаимодействующих с неопсонизированным зимозаном. Интегральные показатели реакции ЛЗХЛ с лейкоцитами бронхоальвеолярного лаважа и крови у 14-суточных цыплят 1-й и 2-й групп статистически значимо не отличаются.

У 28-суточных цыплят 1-й группы в сравнении с 14-суточными птицами той же группы наряду со снижением общего числа плевро-перитонеальных лейкоцитов (до  $20,44 \pm 2,33$  млн. клеток;  $p < 0,05$ ) отмечается увеличение показателей спонтанной хемилюминесценции ( $p < 0,05$ ). В отличие от более молодых животных у них наблюдается статистически значимый ответ при стимуляции неопсонизированным зимозаном в концентрации 1500 мкг/мл ( $p < 0,05$  в сравнении с уровнем спонтанной ЛЗХЛ), при этом интегральные показатели хемилюминесценции в этих пробах выше, чем 14-суточных птиц ( $p < 0,001$ ). Уровень ответа на опсонизированный зимозан статистически значимо не отличается от более молодых цыплят.

У 28-суточных птиц 2-й группы усиливается спонтанная хемилюминесценция ( $p < 0,05$ ) с параллельным увеличением общего числа плевро-перитонеальных лейкоцитов (до  $82,55 \pm 10,72$  млн. клеток;  $p < 0,001$  к 1-й группе). При анализе данных индуцированной опсонизированным и неопсонизированным зимозаном ЛЗХЛ выявляется значительная неоднородность ответа плевро-перитонеальных лейкоцитов птиц 2-й группы в сравнении с 1-й (величина F-отношения колеблется для разных показателей от 5,86 до 402,22;  $p < 0,02-0,00001$ ). Наряду с резко выраженной активацией ответа на зимозан у двух из одиннадцати 28-суточных цыплят 2-й группы у пяти других развивается резко выраженная его супрессия. При этом угнетение ответа на опсонизированный и неопсонизированный зимозан развивается на фоне увеличения уровня спонтанной хемилюминесценции, что может указывать на гиперактивацию фагоцитирующих клеток

*in vivo* с развитием анергии при ответе на зимозан *in vitro*. У 28-суточных животных 2-й группы в сравнении с птицами 1-й группы наряду с увеличением общего числа лейкоцитов бронхоальвеолярного лаважа и крови отмечается выраженная активация продукции ими активных форм кислорода в пробах без зимозана.

В целом результаты работы указывают на то, что у части 14- и 28-суточных цыплят-бройлеров при промышленном содержании развивается выраженный иммунодефицит с гиперактивацией фагоцитирующих клеток

и появлением у части птиц анергии ответа лейкоцитов на зимозан.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Chadfield M., Olsen J. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2001. Vol. 80 (3–4). P. 289–308.
2. Brune K., Leffell M. S., Spitznagel J. K. *Infection and Immunity*. 1972. Vol. 5 (3). P. 283–287.
3. Хлызова Л. А., Шавшукова О. А., Виноградов А. Б., Четвертных В. А., Афанасьевская Е. В., Гордина Е. В. *Пермский медицинский журнал*. 2013. Т. 30, № 2. С. 109–114.

### CHANGES OF PARAMETERS OF LUMINOL-DEPENDENT CHEMILUMINESCENCE OF BROILER CHICKENS UNDER CONDITIONS OF THE BIG BATTERY FARM

Shavshukova O. A.<sup>1</sup>, Khlyzova L. A.<sup>1</sup>, Shilov Ju. I.<sup>2,1</sup>, Shilov S. Ju.<sup>2,1</sup>, Vinogradov A. B.<sup>1</sup>, Chetvertnykh V. A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Acad. E. A. Wagner Perm State Medical University; <sup>2</sup>Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms of the UB RAS, Perm, Russia

The development of severe immunodeficiency with hyperactivation of phagocytes and with significant increase in the production of reactive oxygen species in response on the opsonized and non-opsonized zymosan, the subsequent appearance of anergy of the leukocyte response on zymosan in investigation of the some 14- and 28-day-old «ROSS-308» broiler chickens under conditions of the big chicken farm was found.

*Key words:* broiler chickens, phagocytes, luminol-dependent chemiluminescence, microflora.

### ПРОДУКЦИЯ ЦИТОКИНОВ СПЛЕНОЦИТАМИ МЫШИ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ХОЛОДОВОГО СТРЕССА. ВЛИЯНИЕ ОПИАТНЫХ РЕЦЕПТОРОВ

Шаравьева И. Л.<sup>1</sup>, Тендрякова С. П.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН; <sup>2</sup>Пермский государственный научно-исследовательский университет, Пермь, Россия

Установлено, что в зависимости от продолжительности острого переохлаждения изменяется продукция интерферона-гамма, при часовом переохлаждении данный цитокин усиливается, тогда как под действием 10-минутного переохлаждения этот показатель угнетается, блокада опиатных рецепторов не отменяла модулирующего действия стресса.

*Ключевые слова:* холодовой стресс, опиоидные пептиды, цитокины.

**Актуальность и цель исследования.** Температура относится к важнейшим факторам окружающей среды и в значительной мере определяет жизнедеятельность организмов. Физиологические изменения в организме, свя-

занные с действием холода, включают в себя стимуляцию симпатической нервной системы и гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси, что сопровождается выделением катехоламинов, глюкокортикоидов и модуляцией

продукции ряда других гормонов. Холодовой стресс часто связывают со снижением иммунореактивности, повышением восприимчивости к инфекционным заболеваниям, затяжным течением инфекционных процессов у человека и животных. Есть данные, что острое переохлаждение оказывает влияние на распределение опиатных рецепторов в центральной нервной системе и в периферических тканях. Опиоидная система – одна из важнейших стресс-лимитирующих систем организма, и исследования, направленные на выяснение роли опиоидных пептидов в формировании функций иммунной системы при холодовом стрессе является актуальным направлением в исследованиях нейро-эндокринной регуляции иммунных изменений.

**Цель работы** – изучение влияния острого холодового стресса на продукцию IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IFN- $\gamma$  спленocyтaми мыши в условиях блокады опиатных рецепторов.

**Материалы и методы.** Объектом исследований служили белые лабораторные мыши массой 20–22 г. Животные содержались в условиях лабораторного вивария, при естественном освещении, неограниченном доступе к воде и кормам. Мыши подвергались острому переохлаждению при –20°C в течение 10 или 60 минут. Антагонист опиатных рецепторов налоксона гидрохлорид в дозе 0,2 мг/кг («Narcan», США) вводили подкожно за 20 мин до стресса. Все животные были разбиты на следующие группы: 1-я – контрольная, 2-я – стресс (10-ти или 60-минутное переохлаждение), 3-я – стресс на фоне налоксона, 4-я – введение одного налоксона. Непосредственно после стрессорного воздействия мышей выводили из эксперимента. Спленocyтaты культивировали в иммунологических 96-луночных планшетах. Супернатанты через 24 часа (IL-1 $\beta$ , IL-2) и через 48 часов (IL-4, INF- $\gamma$ ) культивирования собирали в пробирки «Эппендорфф», замораживали и хранили при –20°C. Определение концентрации цитокинов в супернатантах проводили с использованием иммуноферментных тест-систем («R&D», США).

Статистический анализ результатов проводили с использованием факторного анализа и непарного *t*-критерия Стьюдента для межгруппового сравнения.

**Результаты.** Установлено, что 1 часовой холодовой стресс приводил к достоверному увеличению продукции IFN- $\gamma$  в спонтанных

культурах спленocyтaтов, введение налоксона не модифицировало угнетающего действия стресса. В стимулированных Кон А культурах статистически значимого влияния холодового стресса на продукцию IFN- $\gamma$  зафиксировано не было. Холодовой стресс в течение 10 минут приводил к угнетению выработки IFN- $\gamma$  в культурах спленocyтaтов без действия митогена. Переохлаждение в течение 10 минут на фоне блокады опиатных рецепторов налоксона, а также изолированное введение налоксона эффектов не оказывало. На продукцию спленocyтaтами IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4 влияния данного экспериментального воздействия зафиксировано не было.

Под действием холодового стресса может происходить, как угнетение, так и стимуляция иммунной системы. Даже непродолжительное охлаждение приводит к повышению уровня норадреналина и кортизола, лимфоцитозу, снижению лимфопротлиферативных ответов, снижению уровня Th1 цитокинов и IgA в слюне [1]. Группа исследователей под руководством Kizkai T. показала, что холодовой стресс (5°C) в течение 24 ч приводит к активации перитонеальных макрофагов мышей, но при увеличении экспозиции холода до 72 ч – происходит снижение количества активированных клеток, возможно, путем апоптоза [2]. По данным литературы в различных моделях холодового стресса встречается не только угнетающее, но и стимулирующее действие холода на иммунные процессы. Например, у кур в лейкоцитах периферической крови независимо от продолжительности холодового воздействия повышалась экспрессия мРНК для интерлейкина-1 $\beta$ , интерлейкина-6, интерлейкина-12 и интерлейкина-4 [3]. Повышались уровни экспрессии мРНК IgM, IgA, IgG, и интерлейкина-7 при остром и хроническом холодовом стрессе в кишечнике цыплят [4]. Не было зафиксировано влияния на уровни интерлейкина-1 $\beta$  у человека [5]. Несмотря на общее замедление обмена веществ под действием холода иммунологические показатели модулируются в соответствии с интересами организма, направленными на поддержание гомеостаза.

Таким образом, обращает на себя внимание разнонаправленное действие холодового фактора на продукцию спленocyтaтами IFN- $\gamma$  зависимости от продолжительности экспозиции.

Исследование поддержано грантом РФФИ УрО РАН 14-04-96002.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. LaVoy E.C.P., McFarlin B. K., Simpson R. J. *Wilderness & Environmental Medicine* 2011, 22, 343-351.
2. Kizkai T., Suzuki K., Hitomi Y., Iwabuchi K., Onoé K., Ishida H., Izawa T., Ohno H. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2001, 283 (3), 700-706.
3. Hangalapura B.N. et al. *Dev Comp Immunol* 2006, 30, 503-11.
4. Zhao F. Q., Zhang Z. W., Yao H. D. *Research in Veterinary Science* 2013, 95, 146-155.
5. Jansky L. et al. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 1996, 72, 445-50.

## CYTOKINE PRODUCTION BY MICE SPLENOCYTES UNDER COLD STRESS. OPIATE RECEPTORS' EFFECT

Sharav'eva I.L.<sup>1</sup>, Tendryakova S. P.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, UB RAS; <sup>2</sup>Perm State National Research University, Perm, Russia

It is proved that the production of IFN- $\gamma$  depends on the acute cold stress durability. When cold stress duration is one hour then the IFN- $\gamma$  production is enhanced, while under 10-min hypothermia this indicator is inhibited. Opiate receptors blockade did not abolish the modulating effect of this stress.

## ОЦЕНКА ФАГОЦИТАРНОЙ АКТИВНОСТИ ПЕРИТОНЕАЛЬНЫХ КЛЕТОК И ЛЕЙКОЦИТОВ КРОВИ КРЫС С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МАРКЕРА АЦИДИФИКАЦИИ ФАГОСОМ pHrodo™

Шилов С. Ю.<sup>1,2</sup>, Жукова А. Е.<sup>2</sup>, Петухова А. А.<sup>3</sup>,  
Барков С. Ю.<sup>2</sup>, Шилов Ю. И.<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>ФГБУН Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН; <sup>2</sup>ГБОУ ВПО «Пермский государственный медицинский университет имени академика Е. А. Вагнера» Минздрава России; <sup>3</sup>ФГБОУ ВПО «Пермский государственный национальный исследовательский университет», Пермь, Россия

Исследованы половые различия фагоцитарной активности лейкоцитов крови и перитонеальных клеток у крыс с использованием зимозана, меченого отражающим уровнем ацидификации фагосом флюорохромом – зеленым pHrodo™. Установлено, что у самок крыс в сравнении с самцами наблюдается более интенсивная флуоресценция поглощенных объектов. Помимо этого показатели фагоцитоза у самок характеризуются значительно большей вариабельностью, чем у самцов.

**Ключевые слова:** фагоцитоз, фагосомы, лейкоциты крови, перитонеальные фагоциты, pHrodo, крысы, половые различия.

**Актуальность.** Основной методической проблемой при исследовании фагоцитарной активности лейкоцитов радиоизотопным, флуориметрическим и другими инструментальными методами являлась сложность отделения нефагоцитированных меченых объ-

ектов фагоцитоза от поглощенных, которая усугублялась их агглютинацией при взаимодействии с антителами биологических жидкостей. Эта проблема частично решалась при широком внедрении проточной лазерной цитометрии, однако при использовании тра-



диционных флюорохромов, например флюоресцеинизотиоционата (ФИТЦ), в ходе цитофлюориметрического исследования иногда сложно отделить при гейтировании поглощенные объекты от адгезированных [1]. Для решения этой задачи предлагалось использование тушения свечения непоглощенных частиц трипановым синим, параллельное проведение исследования при низких температурах для выключения поглощения с последующим сравнением с опытной пробой, использование для негативного контроля показателей с остановкой поглощения цитохалазином D. Однако эти подходы далеко не всегда позволяют решить проблему и процедура гейтирования становится крайне сложной [1,2]. Поэтому не случайно с большим интересом многие исследователи встретили появление pH-сенситивных флюорохромов, в частности красного и зеленого pHrodo™ (Molecular Probes® / Life Technologies), которые не флюоресцируют при физиологических значениях pH, но начинают светиться под действием возбуждающего света с интенсивностью прямо пропорциональной снижению pH до 4,0. Поскольку в процессе фагоцитоза происходит закисление среды внутри фагосомы, красный и зеленый pHrodo™ стали использоваться для оценки фагоцитоза и процессов ацидификации фагосом [2,3]. В связи с отсутствием флюоресценции при физиологических значениях pH вне фагосомы эти флюорохромы перспективны и для кинетической оценки фагоцитоза с помощью современных флюориметров [4]. Однако рекомендуемые производителями варианты методов не всегда удобны для задач конкретных исследований и имеющегося оборудования.

**Цель работы** – адаптация метода оценки фагоцитарной активности перитонеальных клеток и лейкоцитов крови крыс с использованием зимозана, меченого зеленым pHrodo™, для проточного лазерного цитометра Guava EasyCyte (Millipore).

**Материалы и методы.** Исследования проводили на 18 нелинейных белых крысах в возрасте 4–7 месяцев.

Лейкоциты крови (50 ЕД гепарина/мл крови) выделяли методом седиментации с 0,1% метилцеллюлозой (Sigma-Aldrich, США). Перитонеальные лейкоциты выделяли методом промывания брюшной полости 10 мл среды 199 с добавлением 10 ЕД/мл гепарина. После

двукратного отмывания центрифугированием при 400 g в течение 10 мин клетки ресуспендировали в полной питательной среде (ППС) следующего состава: среда RPMI-1640 без L-глутамина с добавлением 2 mM GlutaMAX™, 1 mM пирувата натрия, 1% заменимых аминокислот в MEM (все Gibco®, life technologies™), 10 mM HEPES (Sigma-Aldrich). Концентрацию клеточной суспензии доводили до  $25 \times 10^6$  клеток/мл ППС.

Технические отличия проточного лазерного цитометра Guava EasyCyte (Millipore) от традиционных цитометров, заключающиеся в отсутствии обтекающей жидкости, малом объеме промывающей жидкости (расход менее 8 мл за 8 часов работы в сравнении с 8000 мл в цитометрах с обтекающей жидкостью), низких потерях анализируемых клеток и расхода реагентов, прямом определении абсолютного количества протекающих клеток на мкл раствора и др., связанных с инновационной ассиметричной структурой капилляра проточной ячейки, а также с цифровой, а не аналоговой обработкой сигнала [5], позволили при адаптации метода существенно снизить объем реагентов. В пробирках Эппендорф смешивали 88 мкл ППС, 4 мкл суспензии лейкоцитов ( $25 \times 10^6$  клеток/мл) и 8 мкл преинкубированной для опсонизации при 37°C в течение 30 мин смеси равных объемов частиц зимозана, меченого зеленым pHrodo™ ( $100 \times 10^6$  частиц/мл; pHrodo™ Green zymosan A BioParticles® conjugate, Molecular probes® by life technologies™, P35365, Lot 1617699), и аутоплазмы.

После перемешивания смеси на Votex-Genie-2 (Scientific Industries, США) пробы инкубировали при 37°C в течение 120 мин. Далее в пробирки вносили по 900 мкл лизирующего раствора (0,15M NH<sub>4</sub>Cl, 0,01M NaHCO<sub>3</sub>, 0,0001M ЭДТА, pH=7,2–7,4), пробы перемешивали и инкубировали в течение 5 мин при комнатной температуре. После осаждения клеток центрифугированием и снятия супернатанта клетки дважды отмывали стоп-реагентом (0,1 объема 0,5 M ЭДТА + 92,95 объема забуференного 10 mM HEPES официального 0,9% раствора хлорида натрия для инъекций). Смесь доводили до объема 250 мкл стоп-реагентом и после тщательного ресуспендирования вносили в 96-луночный плоскодонный планшет для ИФА («Медполимер», Санкт-Петербург).

Для сбора и анализа данных использовали программное обеспечение “Millipore CytoSoft 5.3”, модули “Guava Express Plus/Pro”. Статистический анализ проводили с использованием методов описательной статистики и непарного *t*-критерия Стьюдента. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

**Результаты и обсуждение.** Установлено, что фагоцитарная активность лейкоцитов самцов и самок крыс существенно отличается по интегральным показателям, характеризующим интенсивность свечения всех фагоцитированных объектов ( $X$ –Mean, гейтирование по общему количеству флуоресцирующих событий). Так, средняя интенсивность свечения у самцов с лейкоцитами периферической крови составляет  $35,977 \pm 1,470$  ( $n=10$ ), а у самок –  $93,363 \pm 13,198$  ( $n=8$ ;  $p=0,00328$  по гетероскедастическому варианту *t*-критерия Стьюдента для неравных дисперсий). Этот же показатель с перитонеальными клетками у самцов составляет  $46,132 \pm 3,019$  ( $n=10$ ), а у самок –  $171,812 \pm 55,489$  ( $n=8$ ;  $p=0,04074$  по гетероскедастическому варианту *t*-критерия Стьюдента для неравных дисперсий). Анализ различий дисперсий между двумя группами по *F*-отношению показал высоко статистически значимую неоднородность показателей в группе самок в сравнении с самцами, что, по-видимому, связано с физиологическими колебаниями уровней гормонов при эстральном цикле (6 самок из выборки на момент ис-

следования по данным кольпоцитологии были в фазе проэструса, а 2 – в фазе диэструса). Более детальная взаимосвязь уровня фагоцитоза с фазами эстрального цикла нами продолжает исследоваться.

Таким образом, при оценке фагоцитарной активности перитонеальных клеток и лейкоцитов крови крыс с использованием зимозана, меченого отражающим уровень ацидификации фагосом флуорохромом – зеленым pHrodo™, установлено, что у самок крыс в сравнении с самцами наблюдается более интенсивное свечение поглощенных объектов. Помимо этого показатели фагоцитоза у самок характеризуются значительно большей вариабельностью, чем у самцов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Nuutila J., Lilius E.– M. Cytometry. Part A. 2005 Vol. 65A (2). P. 93-102.
2. Neaga A., Lefor Ju., Lich K. E., Liparoto S. F., Xiao Y. Q. J. Immunol. Methods. 2013. Vol. 390 (1–2). P. 9–17.
3. Colas C., Menezes S., Gutiérrez-Martínez E., Péan C. B., Dionne M. S., Guermontprez P. J. Immunol. Methods. 2014. Vol. 412. P. 1–13.
4. Ruangsri J., Kitani Y., Kiron V, Lokesh J., Brinckmann M. F., Karlsen B. O., Fernandes J. M. O. PLoS One. 2013. 8 (4). P. e62302.
5. King D., Cappione A., Ilkov F., Goldman B., Lefebvre R., Pittaro R., G. J. Dixon G. J. In: The microflow cytometer. Ed. by J. S. Kin, F. S. Ligler. Pan Stanford Publishing Pte. Ltd., 2010. P. 69-87.

### ASSESSMENT OF PHAGOCYtic ACTIVITY OF PERITONEAL CELLS AND WHITE BLOOD CELLS OF RAT USING MARKERS PHAGOSOME ACIDIFICATION pHrodo™

Shilov S. Ju.<sup>1,2</sup>, Zhukova A. E.<sup>2</sup>, Petuhova A. A.<sup>3</sup>,  
Barkov S. Ju.<sup>2</sup>, Shilov Ju. I.<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms of the UB RAS; <sup>2</sup>Acad. E. A. Wagner Perm State Medical University, Perm, <sup>3</sup>Perm State University, Perm, Russia

Sex differences in phagocytic activity of blood leukocytes and peritoneal cells in rats with the pHrodo™ green zymosan A BioParticles® conjugate which reflects the level of phagosome acidification were investigated. It was found that in female rats compared to male observed a more intensive fluorescence of the ingested objects. Besides phagocytosis parameters females have significantly more variable than in males.

**Key words:** phagocytosis, phagosome, white blood cells, peritoneal phagocytes, pHrodo™, rats, sex differences.

## РОЛЬ ТОЛЛ-ПОДОБНОГО РЕЦЕПТОРА 9 В РЕГУЛЯЦИИ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ Т-ЛИМФОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА

Шмаров В. А., Селедцов В. И., Гончаров А. Г., Мелашенко О. Б.,  
Газатова Н. Д., Малащенко В. В., Меняйло М. Е., Тодосенко Н. М.,  
Мельников А. Е., Исмаилова А. З., Найдунова В. Г.

ФГАОУ ВПО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта»,  
Калининград, Россия

Представлены данные проточной цитометрии по экспрессии Толл-подобного рецептора 9 (Toll-like receptor 9, TLR-9) основными субпопуляциями Т-лимфоцитов человека. Полученные данные предполагают наиболее значимую роль лигандов TLR-9 в прямой регуляции функциональной активности хелперных и цитотоксических эффекторных Т-лимфоцитов памяти и «терминально-дифференцированных CD45RA-позитивных» эффекторных Т-лимфоцитов (Th EM, Th TEMRA, CTL EM, CTL TEMRA), имеющих относительно низкий пролиферативный потенциал. Показано, что лиганд TLR-9, олигодезоксирибонуклеотид 2395 (ODN-2395), способен усиливать Т-клеточную продукцию интерферона- $\alpha$  (interferon- $\alpha$ , IFN- $\alpha$ ), IFN- $\gamma$ , интерлейкина-4 (IL-4) и снижать при этом выработку IL-2. Таким образом, TLR-9 может играть значимую роль в модуляции функциональной активности Т-лимфоцитов.

*Ключевые слова:* Толл-подобный рецептор-9, Т-лимфоциты человека, олигодезоксирибонуклеотиды, интерфероны, интерлейкин-2, интерлейкин-4.

**Актуальность и цель работы.** Толл-подобный рецептор 9 (Toll-like receptor 9, TLR-9) является одним из важнейших компонентов системы врожденного иммунитета. TLR-9 распознает бактериальную и вирусную ДНК, содержащую неметилированные цитозин-фосфат-гуанин (cytosine-phosphate-guanine, CpG) мотивы. TLR-9 экспрессируются в эндосомальных компартментах антигенпрезентирующих клеток и при взаимодействии с CpG ДНК индуцируют выработку интерферона- $\alpha$  (interferon- $\alpha$ , IFN- $\alpha$ ) [1].

Существуют данные об экспрессии TLR-9 в Т-лимфоцитах человека в норме [2, 3] и патологии [4]. В то же время прямые эффекты лигандов TLR-9 на функциональную активность Т-клеток человека остаются малоизученными.

**Целью** настоящей работы было оценить экспрессию TLR-9 в субпопуляциях Т-лимфоцитов человека и охарактеризовать прямое влияния его лиганда ODN 2395 на Т-клеточную продукцию IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4.

**Материалы и методы исследования.** Мононуклеарные клетки (МНК) выделяли из периферической крови 5 условно здоровых доноров (средний возраст  $35,6 \pm 5,4$  лет) посредством

градиентного центрифугирования. Позитивную селекцию CD3<sup>+</sup> клеток проводили методом бесколоночной магнитной сепарации (BD<sup>™</sup> IMagnet, BD Biosciences) с использованием биотинилированных анти-CD3 моноклональных антител (Anti-Human CD3 Biotin, eBioscience) и магнитных частиц, конъюгированных со стрептавидином (BD IMag<sup>™</sup> Streptavidin Particles Plus-DM, BD Biosciences). Чистоту выделенной CD3<sup>+</sup> клеточной популяции оценивали на проточном цитофлюориметре (BD Accuri<sup>®</sup> C6 Flow Cytometer, BD Biosciences), применяя PerCP-Cy5.5-конъюгированные анти-CD3 МКАТ (BD Pharmingen<sup>™</sup> PerCP-Cy5.5<sup>™</sup> mouse Anti-Human CD3, BD Biosciences)

Выделенные CD3 клетки культивировали в концентрации  $1 \times 10^6$  клеток/мл в бессывороточной среде (TechMACS, Miltenyi Biotech) с частицами, конъюгированными с МКАТ к CD2, CD3 и CD28 (T Cell Activation/Expansion Kit human, MACS Miltenyi Biotech) или без них в контроле в течение 48 ч. В часть проб в начале культивирования добавляли ODN 2395 (Nycult Biotech).

Для выявления экспрессии TLR-9 к Т-клеткам добавляли ODN 2395 FITC (InvivoGen) в концентрации 1  $\mu$ M. Далее клетки культиви-

ровали в течение 6 часов согласно инструкции производителя ODN 2395 FITC. После культивирования клетки окрашивали мечеными флюорохромами МКАТ к CD4, CD8a, CD197 (eBioscience) и CD45RA (BD Biosciences). Экспрессию TLR-9 Т-клеточными субпопуляциями оценивали по связыванию ODN 2395 FITC.

Уровни IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4 в культуральных супернатантах определяли методом иммуноферментного анализа с использованием коммерческих тест-систем (ЗАО «ВЕКТОР-БЕСТ»).

**Результаты и обсуждение.** Согласно имеющимся данным, синтетический CpG олигонуклеотид 2395 (ODN 2395) является лигандом TLR-9 и индуктором продукции IFN- $\alpha$  в плазмоцитоподобных дендритных клетках и В-лимфоцитах.

Представляло интерес исследовать экспрессию TLR-9 в Т-клетках по их связыванию с ODN 2395-FITC. Мы нашли, что TLR-9 экспрессировался в 0,8 $\pm$ 0,2% наивных Т-хелперов (Th Naïve, CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD197<sup>+</sup>), 0,6 $\pm$ 0,3% центральных Т-хелперов памяти (Th CM, CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD197<sup>+</sup>), 5,1 $\pm$ 0,4% эффекторных Т-хелперов памяти (Th EM, CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD197<sup>+</sup>), 6,4 $\pm$ 0,4% «терминально-дифференцированных CD45RA-позитивных» эффекторных Т-хелперов (Th TEMRA, CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD197<sup>+</sup>), 0,8 $\pm$ 0,3% цитотоксических Т-лимфоцитов наивных (CTL Naïve, CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD197<sup>+</sup>), 11,8 $\pm$ 1,1% эффекторных цитотоксических Т-лимфоцитов памяти (CTL EM, CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD197<sup>+</sup>), 12,9 $\pm$ 0,1% «терминально-дифференцированных CD45RA-позитивных» эффекторных цитотоксических Т-лимфоцитов (CTL TEMRA, CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD197<sup>+</sup>) и не экспрессировался в центральных цитотоксических Т-лимфоцитах па-

мяти (CTL CM, CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD197<sup>+</sup>). Полученные данные предполагают наиболее значимую роль лигандов TLR-9 в прямой регуляции функциональной активности хелперных и цитотоксических EM и TEMRA клеток, имеющих относительно низкий пролиферативный потенциал.

Добавление ODN-2395 в культуру Т-лимфоцитов индуцировало продукцию IFN- $\alpha$  (164,3 $\pm$ 12,1 пг/мл при концентрации ODN-2395 0,3  $\mu$ M и 71,0 $\pm$ 9,3 пг/мл при 3,0  $\mu$ M,  $p < 0,05$ ). В отсутствие ODN 2395 продукция IFN- $\alpha$  не выявлялась. С другой стороны, ODN-2395 в концентрации 1,0  $\mu$ M снижал продукцию IL-2 активированными Т-клетками (с 7440,0 $\pm$  410,2 пг/мл до 6804,0 $\pm$ 319,5 пг/мл), оказывая при этом стимулирующие эффекты на выработку IL-4 (с 46,5 $\pm$ 12,2 до 184,5 $\pm$ 21,4 пг/мл,  $p < 0,05$ ) и IFN- $\gamma$  (с 1383,0 $\pm$ 115,2 до 4567,5 $\pm$ 216,2 пг/мл,  $p < 0,05$ ). Таким образом, активация TLR-9 может снижать пролиферацию Т-лимфоцитов и одновременно усиливать их иммуностимулирующую активность. Дальнейшие исследования будут направлены на то, чтобы детально охарактеризовать эффекты лигандов TLR-9 на Т-хелперную направленность иммунных реакций.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. West P., Koblansky A., Ghosh S. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2006, 22, 409-37.
2. Ярилин А. А. Иммунология: учебник. ГЭОТАР-Медиа, Москва 2010.
3. Абагуров А. Е., Волосовец А. П., Юлиш Е. И. *Здоровье ребенка* 2012, 5 (40), 116-121.
4. Klonowska-Szymczyk A., Wolska A., Robak T., Cebula-Obrzut B., Smolewski P., Robak E. *Mediators of Inflammation* 2014, 1, article ID 381418, 11 pages, doi: 10.1155/2014/381418.

## THE ROLE OF TOLL-LIKE RECEPTOR 9 IN HUMAN T-LYMPHOCYTE FUNCTIONAL ACTIVITY

Shmarov V. A., Seledtsov V. I., Goncharov A. G., Melashchenko O. B., Gazatova N. D., Malashchenko V. V., Meniailo M. E., Todosenko N. M., Melnikov A. E., Ismailova A. Z., Naydunova V. G.

*Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russia*

We have presented the flow cytometry data on expressing TLR9 (Toll-like receptor 9, TLR-9) by major human T-subsets. The results suggest the most significant role of ligands TLR-9 in the direct regulation of the functional activity of helper and cytotoxic effector memory T-lymphocytes and «terminally-differentiated CD45RA-positive» effector T lymphocytes (Th EM, Th TEMRA, CTL EM, CTL TEMRA) having a relatively low proliferative potential. The TLR-9 ligand oligodeoxynucleotide 2395 (ODN-2395) was found to amplify T-cell production of interferon- $\alpha$  (interferon- $\alpha$ , IFN- $\alpha$ ), IFN- $\gamma$ , interleukin-4 (IL-4) and to reduce the IL-2 production by T cells. Thus, TLR-9 may play a significant role in modulating the functional activity of T-lymphocytes.

## ВЛИЯНИЕ ИНТЕРЛЕКИНОВ-7 И -15 НА ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ TCR-AКТИВИРОВАННЫХ НАИВНЫХ Т-ЛИМФОЦИТОВ *IN VITRO*

Юрова К.А., Сохоневич Н.А., Хазиахматова О.Г.,  
Литвинова Л.С.

ФГАОУ ВПО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта»,  
Калининград, Россия

Выявлено разнонаправленное, дозозависимое действие цитокинов – ИЛ-7 и ИЛ-15 на процессы созревания и дифференцировки наивных Т-лимфоцитов, ассоциированные с изменением транскрипции мРНК гена *hnRNPL* и мембранной экспрессии молекулы – CD28. Установлено, что созревание и дифференцировку наивных (CD3<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>) Т-лимфоцитов *in vitro* потенцируют ИЛ-7 в концентрации 0,1x10<sup>-9</sup> г/мл и ИЛ-15 в дозе – 1,0x10<sup>-9</sup> г/мл.

**Ключевые слова:** наивные Т-лимфоциты, ИЛ-7, ИЛ-15, дифференцировка лимфоцитов, TCR-активация.

**Актуальность и цель работы.** Процессы активации, созревания и дифференцировки наивных Т-клеток в Т-клетки памяти или эффекторы, сопровождаются появлением коротких изоформ рецептора CD45 – CD45RO вместо высокомолекулярных CD45RA [1], а также потерей поверхностных молекул, в частности CD28 [2]. Предполагают, что экспрессия молекулы позитивной костимуляции – CD28 напрямую связана с транскрипцией мРНК гена *hnRNPLL* (Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein, hnRNP LL-типа) [3], продукты которого являются ключевыми звеньями в регуляции процесса альтернативного сплайсинга гена *Ptprc*, кодирующего общелейкоцитарный рецептор CD45. Повышенная транскрипция мРНК гена *hnRNPLL* приводит к экспрессии коротких изоформ молекулы CD45 – CD45RO, что связано с активацией молекулярных механизмов, приводящих к пропуску 4 экзона [4]. Мы предполагаем, что цитокины – ИЛ-7 и ИЛ-15 могут принимать непосредственное участие в процессах созревания и дифференцировки Т-клеток за счет регуляции альтернативного сплайсинга гена *Ptprc*. В представленной работе оценено влияние цитокинов – ИЛ-7 и ИЛ-15 на взаимосвязь между изменением уровней мРНК гена *hnRNPLL* и мембранной экспрессией костимуляторной молекулы – CD28 в механизмах дифференцировки наивных (CD3<sup>+</sup>

CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>) Т-клеток здоровых доноров в условиях TCR-активации *in vitro*.

**Материалы и методы.** Материалом исследования служила венозная кровь 58 здоровых доноров. Популяцию наивных (CD3<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>) Т-лимфоцитов получали из взвеси мононуклеарных клеток методом иммуномагнитной сепарации (MidiMACS Separator, LS Columns, Miltenyi Biotec, Германия) и инкубировали 48 часов при 37°С и 5% CO<sub>2</sub> с использованием бессывороточной среды Искова в присутствии рекомбинантных форм цитокинов ИЛ-7 и ИЛ-15 и клеточного активатора. В качестве активатора Т-лимфоцитов использовали реагент Т-Cell Activation/Expansion Kit human (Ac/Exp) («Miltenyi Biotec», Германия). Соотношение клеток и активирующих частиц составляло 1:2.

В эксперименте были использованы следующие варианты культивирования: 1) интактная проба; 2) проба с добавлением Ac/Exp; 3) пробы с добавлением Ac/Exp и rIL-7/rIL-15 (0,1x10<sup>-9</sup> г/мл; 0,5x10<sup>-9</sup> г/мл; 1,0x10<sup>-9</sup> г/мл). Содержание CD45RA<sup>+</sup>/CD45RO<sup>+</sup> и CD28<sup>+</sup> Т-клеток в CD45RA<sup>+</sup>-культурах, определяли методом проточной цитофлуориметрии с помощью МКАТ, конъюгированных с FITC, PE и APC («Abcam», Великобритания, «e-Bioscience», США). Анализ поверхностных маркеров проводили на проточном цитофлуориметре «MACS Quant» («Miltenyi

Biotec», Германия) согласно протоколу фирмы-производителя. Результаты цитометрического анализа были проанализированы с помощью программы «KALUZA Analysis Software» (Beckman Coulter, США). Тотальная РНК из клеточных культур была выделена с использованием реагентов ExtractRNA Kit («Евроген», Россия); степень очистки РНК определяли по соотношению A260/280; качество полученных образцов оценивали с использованием электрофореза в 1,5%-агарозном геле с применением бромистого этидия. Выделенная РНК была использована в реакции обратной транскрипции с применением реагентов MMLV Kit («Евроген», Россия). Для затравки использовали oligo (dT) 23-primer в концентрации 20 мкМ. Для определения уровня относительной экспрессии гена *hnRNPLL* была проведена мультиплексная RT-PCR с применением реагентов qPCRmixHS («Евроген», Россия), специфических зондов TaqMan и праймеров в концентрации 10 пМ. В качестве матрицы использовались 5 мкл кДНК, в качестве референсного гена – ген *GAPDH*. Последовательности праймеров были подобраны и предварительно проверены с помощью он-лайн программы BLAST. Олигонуклеотидные праймеры были синтезированы фирмой Beagle (Россия). Для проведения RT-PCR использовали следующие праймеры: *hnRNPLL\_for* 5'-CTCTCAATTCAGAATCCGCTTTATC-3'; *hnRNPLL\_rev* 5'-CCATTGCTTGTATCCCATTCTC-3'; *GAPDH\_for* 5'-GAAGGTGAAGGTCGGA GTC-3'; *GAPDH\_rev* 5'-GAAGATGGTGGAT TTC-3'; зонды: *hnRNPLL\_probe* FAM-5'-TATGCAACCCTGTTGGCAAAGTGC-3'~BHQ-1 и *GAPDH\_probe* HEX-5'-CAAGCTTCCCGTTCTCAGCC-3'-BHQ-1.

RT-PCR проводилась в трех повторах с применением LightCycler 480 Real-Time PCR («Roche», Швейцария) в температурном режиме: 95 °С – 5 мин; 95 °С – 20 с, 60 °С – 30 с, 72 °С – 1 мин – 45 циклов; 72 °С – 5 минут. Расчеты уровней относительной экспрессии исследуемых генов производили с помощью модифицированной формулы Пфаффа. Полученные результаты были проанализированы с использованием пакета статистических программ SPSS\_20.

**Результаты.** Культивирование TCR-активированных CD3<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> Т-лимфоцитов с rIL-7 и rIL-15, в целом, повышало уровень транскрипции мРНК гена *hnRNPLL*. Сочетанное использование CD2/CD3/CD28-комплекса и rIL-15 в максимальной концентрации

(1,0x10<sup>-9</sup> г/мл) приводило к достоверному снижению числа CD3<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> Т-клеток. Более чувствительной к эффектам rIL-15 оказалась популяция цитотоксических (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>) лимфоцитов. Инкубация CD3<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> Т-клеток с rIL-7 (0,1x10<sup>-9</sup> г/мл), напротив, затрагивала хелперную субпопуляцию наивных Т-лимфоцитов, достоверно снижая число CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> Т-клеток по сравнению с пробой только с добавлением активатора. Добавление в среду культивирования TCR-активированных CD3<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> Т-лимфоцитов rIL-7 (1,0x10<sup>-9</sup> г/мл) и rIL-15 (0,1x10<sup>-9</sup> г/мл), приводило к снижению числа Т-клеток, несущих короткий вариант рецептора CD45 – CD45RO<sup>+</sup> и дубль-позитивных CD45RA<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> Т-клеток. Напротив, инкубация наивных Т-клеток с минимальной концентрацией rIL-7 (0,1x10<sup>-9</sup> г/мл) и максимальной rIL-15 (1,0x10<sup>-9</sup> г/мл), сопровождалась увеличением числа дубль-позитивных CD45RA<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> лимфоцитов.

Проведенное исследование позволило выявить разнонаправленное действие цитокинов IL-7 и IL-15 на созревание и дифференцировку наивных Т-лимфоцитов, ассоциированные с изменением транскрипции мРНК гена *hnRNPL* и мембранной экспрессией молекулы – CD28. Цитокины – IL-7 (0,1x10<sup>-9</sup> г/мл) и IL-15 (1,0x10<sup>-9</sup> г/мл) при действии *in vitro* потенцируют созревание и дифференцировку TCR-активированных наивных (CD3<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>) Т-лимфоцитов в Т-клетки памяти и эффекторы. Максимальные концентрации IL-7 (1,0x10<sup>-9</sup> г/мл) и низкие – IL-15 (0,1 и 0,5\*10<sup>-9</sup> г/мл), напротив, ограничивают дифференцировку наивных Т-клеток, индуцированную активацией.

Работа выполнена в рамках стипендии Президента РФ (СП-454.2013.4) и субсидии на выполнение государственной работы «Организация проведения научных исследований» (№ 603).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Litvinova L. S., Sokhnevich N. A., Gutsol A. A., Kofanova K. A. Cell and Tissue Biology 2013, 7 (6), 539-544.
2. Кудрявцев И. В. Российский иммунологический журнал 2014, 8 (4), 947-964.
3. Butte M. J., Lee S. J., Jesneck J. et al. Plos One 2012, Mode of access: <http://dash.harvard.edu/bitstream/handle/1/10436326/3386953.pdf.sequence=1>
4. Topp D. J., Jackson J., Melton A. A. et al. RNA. 2008, 14, 2038-2049.

## INFLUENCE OF IL-7, IL-15 ON TCR-ACTIVATED NAÏVE T-CELL DIFFERENTIATION IN VITRO

Khaziakhmatova O. G., Sokhnevich N. A., Yurova K. A., Litvinova L. S.

*Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russia*

Multidirectional, dose-dependent effect of cytokines – IL-7 and IL-15 on the differentiation and maturation of naive T-cells associated with a change in mRNA transcription and membrane expression hnRNPL molecule – CD28 was detected. It was established that *in vitro* IL-7 in a concentration of  $0,1 \times 10^{-9}$  g/ml, and IL-15 in a dose –  $1,0 \times 10^{-9}$  g/ml potentiated the maturation and differentiation of naive ( $CD3^+ CD45RA^+ CD62L^+$ ) T lymphocytes.

---

## ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ РОЛИ КАТЕЛИНОПОДОБНОГО БЕЛКА ЧЕЛОВЕКА В РЕАЛИЗАЦИИ ЗАЩИТНЫХ РЕАКЦИЙ ОРГАНИЗМА

Юхнев В. А.<sup>1</sup>, Юхнева М. А.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ФГБНУ «Институт Экспериментальной медицины»; <sup>2</sup>ФГБУ НИИ Гринпа, Санкт-Петербург, Россия

Исследована биологическая активность компонента гранулярного аппарата нейтрофилов – кателино-подобного белка (КПБ), роль которого в реализации механизмов врожденного иммунитета до настоящего времени остается не выясненной. Установлено, что в присутствии КПБ человека снижается цитотоксическое действие антимикробных пептидов нейтрофилов (альфа-дефенсинов и кателицидина человека) в отношении эукариотических клеток, но сохраняется их антимикробная активность; показано модулирующее действие КПБ на секрецию цитокинов мононуклеарами периферической крови человека, стимулированными введением липополисахарида, *in vitro*.

**Ключевые слова:** врожденный иммунитет, антимикробные пептиды нейтрофилов, кателино-подобный белок.

Антимикробные пептиды из семейства кателицидинов являются одними из важных защитных факторов врожденного иммунитета и представляют мажорную фракцию белковых компонентов специфических гранул нейтрофилов. Кателицидины содержатся в гранулах в виде проформ, состоящих из N-концевого консервативного домена – кателино-подобного домена и C-концевого варибельного участка [1]. При развитии инфекционного процесса в ходе активации нейтрофилов и выброса во внеклеточное пространство содержимого гранул разного типа происходит расщепление молекулы-предшественника кателицидина (у человека hCAP18), в результате чего высвобождается активный антимикробный пептид – кателицидин

человека LL-37, входящий в состав C-концевого участка, и кателино-подобный белок (КПБ). Биологическая активность антимикробных пептидов-кателицидинов интенсивно изучалась, однако функции кателино-подобного белка до сих пор остаются малоизученными. Выяснение роли КПБ в реализации различных защитных реакций является актуальной задачей иммунологии и биомедицины, так как внесет вклад в решение фундаментальной задачи расшифровки молекулярных механизмов функционирования системы врожденного иммунитета.

Целью данной работы явилось исследование биологической активности кателино-подобного белка (КПБ), его влияния на функ-

циональную активность антимикробных пептидов человека.

**Методы.** Для оценки антимикробной активности белков применяли метод радиальной диффузии в агарозном геле [2]. Оценку цитотоксического действия образцов в отношении культивируемых клеток человека проводили с использованием стандартного МТТ-теста или путем оценки включения в клетки красителя трипанового синего, как описано [3, 4]. Мононуклеарные клетки и нейтрофилы человека получали из крови здоровых доноров по общепринятым методикам. Для оценки влияния полипептидов на функциональную активность мононуклеарных клеток периферической крови и нейтрофилов человека исследуемые препараты вносили в суспензии клеток, стимулированных введением липополисахарида (ЛПС) в концентрации 20 нг/мл, и инкубировали в течение 20 ч в CO<sub>2</sub> инкубаторе. Концентрацию цитокинов в среде определяли с использованием иммуноферментного анализа, выполненного с применением наборов фирмы «ООО Цитокин», Россия. В работе использованы химически синтезированные пептиды LL-37 и rCRAMP, и рекомбинантные белки hCAP18 (полноразмерный кателицин человека) и КПБ, произведенные фирмой BiologicsCorp (США). Чтобы убедиться в отсутствии в пробах примеси бактериального липополисахарида применяли хромогенный Лимулюс тест (Pierce, США). Для дополнительной очистки рекомбинантного белка от ЛПС использовали полимиксин В агарозу. Статистическую обработку данных проводили в программе Prism5. Достоверность различий между группами оценивали с применением U-критерия Вилкоксона-Манна-Уитни. Во всех расчетах за достоверный принимали 95% уровень значимости ( $P < 0,05$ ).

**Результаты исследований.** Исследовано влияние hCAP18 и КПБ на антимикробную активность LL-37 и дефенсина HNP-1 (АМП нейтрофилов человека), показано, что антимикробная активность как LL-37, так и HNP-1 в отношении грамотрицательной бактерии *Escherichia coli* ML35p и грамположительной бактерии *Listeria monocytogenes* EGD не изменяется в присутствии эквимоллярных концентраций hCAP18 или КПБ, что свидетельствует о том, что данные белки не влияют на антимикробное действие АМП. Однако, при исследовании эффектов hCAP18 и КПБ на цитотокси-

ческую активность LL-37 в отношении клеток K-562 и мононуклеаров периферической крови человека (МТТ-тест), показано, что цитотоксическое действие LL-37 (20 мкМ) в отношении культивируемых клеток K-562 и мононуклеарных клеток не изменяется в присутствии hCAP18, однако снижается на 43% в отношении K-562 и на 31% в отношении мононуклеаров в присутствии КПБ (20 мкМ). На цитотоксическое действие дефенсина оба исследуемых белка не влияли. Можно предположить, что снижение цитотоксического действия LL-37 в присутствии КПБ объясняется снижением общего положительного заряда пептида при взаимодействии с анионными группами в молекуле КПБ. Аналогичные данные получены и при изучении влияния КПБ, выделенного нами из нейтрофилов крысы, на цитотоксическую активность кателицидина крысы rCRAMP: количество жизнеспособных клеток в культуре K-562, определяемое с помощью подсчета клеток, включивших витальный краситель трипановый синий, повышалось на 45% при добавлении в инкубационную среду. Изучено влияние КПБ и hCAP18 на функциональную активность мононуклеаров периферической крови человека *in vitro*, а также на эффекты пептида LL-37 на эти клетки, а именно, на выделение цитокинов мононуклеарами, стимулированными введением ЛПС. Из литературы известно, что LL-37 снижает выброс цитокинов мононуклеарными клетками в ответ на введение ЛПС. Нами показано, что при инкубации клеток, обработанных ЛПС (20 нг/мл), с hCAP18 (0,2 мкМ) или КПБ (0,2 мкМ) выделение провоспалительного цитокина ИЛ-1 $\beta$  не изменяется по сравнению с контрольными пробами, где клетки инкубировали в присутствии ЛПС без полипептидов. При внесении в суспензии клеток LL-37 (0,2 мкМ) уровень цитокина в среде после инкубации клеток снижался на 53 $\pm$ 8%. При добавлении к ЛПС-стимулированным клеткам пептида в комбинации с hCAP18 эффект LL-37 не изменялся, а в комбинации с КПБ несколько угнетался (уровень цитокина уменьшался лишь на 16 $\pm$ 3%). Выброс из стимулированных мононуклеаров другого провоспалительного цитокина – ФНО $\alpha$  – снижался по сравнению с контрольными пробами (клетки с ЛПС) на 61 $\pm$ 9% в присутствии LL-37, на 28 $\pm$ 3% в присутствии hCAP18 и на 18 $\pm$ 7% в присутствии КПБ. Эффект LL-37 сохранялся при его



совместном применении с hCAP18 (снижение уровня цитокина в среде на  $67\pm 8\%$ ) и несколько угнетался при добавлении КПБ (снижение уровня ФНО $\alpha$  на  $26\pm 4\%$ ). Иная картина наблюдалась при оценке уровня противовоспалительного цитокина ИЛ-10: его уровень снижался в присутствии LL-37 и не менялся в присутствии hCAP18, но значительно повышался в присутствии КПБ (на  $53\pm 14\%$ ). Эффект LL-37 сохранялся при его совместном применении с hCAP18, но не с КПБ – в этом случае происходило повышение уровня цитокина на  $18\pm 5\%$ . Таким образом, установлено, что в присутствии КПБ снижается цитотоксическое действие АМП в отношении эукариотических клеток, но сохраняется их антимикроб-

ная активность; показаны разнонаправленное модулирующее действие КПБ на мононуклеары периферической крови человека.

Поддержано грантом РФФИ № 13-04-02102а..

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Zanetti M. // Journal of Leukocyte Biology. – 2004. – V. 75. – P. 39-47.
2. Lehrer R. I., Rosenman M., Harwig S. S. et al. // J Immunol Methods. – 1991. – Vol. 137. – P. 167-173.
3. Шамова О. В., Сакута Г. А., Орлов Д. С. и др. // Цитология. – 2007. – Том 49, № 12. – С. 1000-1010.
4. Шамова О. В., Орлов Д. С., Пазина Т. Ю. и др. // Фундаментальные исследования. – 2012. – № 5 (часть 1). – С. 207-212.

### STUDY OF A BIOLOGICAL ROLE OF HUMAN CATELIN-LIKE PROTEIN IN THE REALIZATION OF HOST DEFENSE REACTIONS

Yukhnev V. A.<sup>1</sup>, Yukhneva M. A.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institute for experimental medicine; <sup>2</sup>Research Institute of influenza, St-Petersburg, Russia

The biological activity of human cathelin-like protein (CLP) has been studied. This protein is a component of neutrophil granules, and its role in realization of innate immunity mechanisms remains unclear by now. We have shown that in the presence of CLP a cytotoxic action of antimicrobial peptides of neutrophils (human alpha-defensins and cathelicidin) towards eukaryotic cells was decreased while their antimicrobial activity was not altered. The modulatory effects of CLP on the cytokines release by human peripheral monocytic cells stimulated by lipopolysaccharide addition has been explored in vitro.

*Key words:* innate immunity, antimicrobial peptides of neutrophils, cathelin-like protein.

## ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ХИМИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННОГО ФЛАВОНОИДА НА СЕКРЕТОРНУЮ АКТИВНОСТЬ МИТОГЕН-АКТИВИРОВАННЫХ МОНОНУКЛЕАРНЫХ КЛЕТОК

Лаптев О. С.<sup>1,3</sup>, Албегова Д. З.<sup>1</sup>, Павлова С. И.<sup>2</sup>,  
Кенкишвили А. О.<sup>1</sup>, Кягова А. А.<sup>1</sup>, Козлов И. Г.<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>ГБОУ ВПО Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н. И. Пирогова Минздрава России, Москва; <sup>2</sup>ФГБОУ ВПО Чувашский государственный университет им. И. Н. Ульянова, Чебоксары; <sup>3</sup>ФГБУ ФНКЦ Детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Д. Рогачева, Москва, Россия

В настоящее время при лечении аутоиммунных заболеваний используются несколько классов лекарственных препаратов, в основном – глюкокортикостероиды, цитостатики, ингибиторы кальциневрина и специфические моноклональные антитела. При назначении терапии группами кортикостероидов и цитостатиков наблюдается значительное число выраженных побочных эффектов, связанных с механизмом действия данных групп препаратов. В группах препаратов ингибиторов кальциневрина и моноклональных антител отмечается значительное уменьшение количества серьезных побочных эффектов, однако к препаратам данных групп достаточно быстро развивается резистентность, а также стоимость производства как субстанции данных веществ (белков), так и самих препаратов достаточно высока. В связи с этим интересным для изучения представляется класс флавоноидов и их химических модификаций, за счет механизма ингибирования внутриклеточных сигнальных молекул, таких семейств как JAK, TYK и STAT приводящего к «переключению» иммунного ответа. В настоящем исследовании было показано вероятное влияние исследуемого агента на «переключение» иммунного ответа.

*Ключевые слова:* флавоноиды, цитокины, моноклеары.

На данный момент большой интерес у исследователей вызывают вещества способные влиять на внутриклеточные сигнальные молекулы, в частности на белковые молекулы семейств JAK, TYK и STAT [1, 2, 3, 4]. При ингибировании выработки некоторых белковых молекул этих семейств изменяется секреторная функция МНК, приводящая к «переключению» иммунного ответа. По результатам исследований, проведенных в последние десятилетия, соединения класса флавоноидов показали достоверную активность в отношении вышеуказанных сигнальных трансмиттеров. Также были показаны противоопухолевые, цитотоксические, противовоспалительные, гептопротекторные, ангиопротекторные и другие положительные эффекты данного класса веществ. Основываясь на данных фактах было решено исследовать влияние химически мо-

дифицированного флавоноида (ХМФ) на изменене секреции цитокинового профиля моноклеарными клетками (МНК) [5].

Целью исследования было изучение влияния химически модифицированного флавоноида (ХМФ) и препарата сравнения кверцетина дигидрата (КД) на цитокиновый профиль активированных мышинных МНК *in vitro* в качестве показателя функциональной активности и путей дифференцировки Т-хелперов.

Основываясь на результатах, полученных в предыдущих исследованиях, в качестве источника Т-лимфоцитов использовали суспензию клеток паховых лимфатических узлов интактных мышей. Выделенные клетки, культивировали в присутствии митогена конканавалина А (КонА) и ХМФ в концентрациях  $10^{-8}$  и  $5 \times 10^{-8}$  моль/мл. КД использовали в тех же концентрациях –  $10^{-8}$  и  $5 \times 10^{-8}$  моль/мл. Через

24 и 48 ч культивирования выделяли супернатанты и определяли концентрации цитокинов (ИЛ-1, ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-10, ИЛ-17, ИФН $\gamma$ , ФНО $\alpha$ , ГМ-КСФ) цитофлуориметрическим методом, используя набор реактивов Mouse Th1/Th2 FlowCytomix Multiplex.

За числовые результаты были приняты пиковые концентрации для каждого определяемого типа цитокинов в супернатанте прекультивируемых МНК, активированных Кон-А на сроках 24-48 ч. В условиях проводимого эксперимента в супернатантах определялись: ИЛ-2, ИФН $\gamma$ , ИЛ-6 и ИЛ-17. Исходя из изменения цитокинового профиля, можно предположить, что активация МНК лимфоузлов КонА вызывает провоспалительный цитокиновый ответ.

В контрольных пробах уровень цитокинов составил для ИЛ-2, ИФН $\gamma$ , ИЛ-17 и ИЛ-6 соответственно: 475,3 $\pm$ 44,8; 7265,4 $\pm$ 321,3; 5236,2 $\pm$ 362,3 и 280,4 $\pm$ 20,3. После преинкубации МНК с ХМФ уровень цитокинов изменялся в зависимости от концентрации препарата, внесенного в суспензию клеток. При добавлении ХМФ в концентрации 10<sup>-8</sup> моль/мл уровень ИЛ-2 составил – 265,4 $\pm$ 24,8 пг/мл. В концентрации 5 $\times$ 10<sup>-8</sup> моль/мл ХМФ приводил к резкому угнетению секреции ИЛ-2 так, что значения последнего находились на пороговом уровне определения и составил 37,5 $\pm$ 3,9 пг/мл.

При рассмотрении полученных результатов можно предположить, что значительное увеличение продукции цитокинов ИФН $\gamma$  и ИЛ-17, в условиях поставленного эксперимента в момент активации CD4<sup>+</sup> Т-хелперов запускалась их дифференцировка по путям образования Th1 и Th17 субпопуляций. Главным секреторным агентом Th17-лимфоцитов является ИЛ-17, а ИФН $\gamma$ , в свою очередь, является ключевым цитокином Th1-клеток. Следует отметить, что во всех изучаемых концентрациях ХМФ выражено и достоверно ( $p < 0,05$ ) увеличивал уровень секреции ИЛ-17, одновременно с этим снижая концентрацию секретируемого ИФН $\gamma$ . При внесении ХМФ в концентрации 10<sup>-8</sup> моль/мл было отмечено значительное снижение секреции ИФН $\gamma$  4428,3 $\pm$ 212,4 пг/мл, и увеличение ИЛ-17-7769,9 $\pm$ 331,7 пг/мл. При внесении ХМФ в концентрации 5 $\times$ 10<sup>-8</sup> моль/мл наблюдалось прогрессия наблюдаемых выше эффектов: уровень ИФН $\gamma$  продолжал снижаться до значений – 2956,4 $\pm$ 133,2 пг/мл, а уровень ИЛ-17 повышался до значений –

8645,3 $\pm$ 198,3 пг/мл. Такие изменения цитокинового профиля, скорее всего, свидетельствуют о способности ХМФ «переключать» Th1 иммунный ответ на формирование Th17 субпопуляции хелперных лимфоцитов.

При внесении ХМФ в концентрациях 10<sup>-8</sup> и 5 $\times$ 10<sup>-8</sup> моль/мл значения секреции ИЛ-6 недостоверно ( $p > 0,05$ ) и незначительно возрастали до значений 337,8 $\pm$ 20,9 пг/мл и 559,6 $\pm$ 16,2 пг/мл соответственно. Данный факт указывает на частичное влияние ХМФ на секрецию мононуклеарами цитокина ИЛ-6.

Для препарата сравнения КД значения уровня цитокинов отличались от значений, полученных в группе ХМФ. В концентрации КД 10<sup>-8</sup> моль/мл было отмечено повышение ИФН $\gamma$  – 8568,3 $\pm$ 324,5 пг/мл, уровень ИЛ-17 находился ниже порога чувствительности прибора. При внесении КД в концентрации 5 $\times$ 10<sup>-8</sup> моль/мл наблюдалось повышение уровня секреции ИФН $\gamma$  до 9376,2 $\pm$ 237,4 пг/мл, концентрация ИЛ-17 также находилась ниже порога определения. Была отмечена значительная разница в продукции ИЛ-2 по сравнению с ХМФ. При добавлении КД в концентрации 10<sup>-8</sup> моль/мл уровень ИЛ-2 составил – 457,4 $\pm$ 35,6 пг/мл, а при внесении КД в концентрации 5 $\times$ 10<sup>-8</sup> моль/мл уровень ИЛ-2 незначительно повышался и составлял 481,3 $\pm$ 42,5 пг/мл, что достоверно не отличалось от контрольных значений. Такие изменения цитокинового профиля, скорее всего, свидетельствуют о способности КД активировать Th1 ответ.

При внесении КД в концентрациях 10<sup>-8</sup> и 5 $\times$ 10<sup>-8</sup> моль/мл значения секреции ИЛ-6 значимо не изменялись по отношению к контролю и между собой, и составили – 312,6 $\pm$ 18,3 пг/мл и 318,7 $\pm$ 14,1 пг/мл соответственно. Данный факт указывает на отсутствие влияния КД на секрецию мононуклеарами цитокина ИЛ-6.

Таким образом, экспериментальные данные, полученные при изучении профиля цитокинов, позволяют свидетельствовать, что:

1. КонА-активированные клетки, выделенные из лимфатических узлов мыши, при культивировании в условиях *in vitro* секретируют следующие цитокины: ИЛ-2, ИЛ-6, ИЛ-17, ИФН $\gamma$ ;

2. ХМФ в соответствующих концентрациях подавляют секрецию ИЛ-2 КонА-активированными клетками лимфоузлов при культивировании их в условиях *in vitro*. КД достоверно не изменяет секрецию ИЛ-2 ни в одной из концентраций;

3. ХМФ дозозависимо подавляют секрецию ИФН $\gamma$  и увеличивают секрецию ИЛ-17 К $\alpha$ Н-активированными клетками лимфоузлов при культивировании их в условиях *in vitro*;

4. КД дозозависимо активирует секрецию ИФН $\gamma$  К $\alpha$ Н-активированными клетками лимфоузлов при культивировании их в условиях *in vitro*.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Минеев В. Н., Сорокина Л. Н. Современные представления о JAK-STAT системе как новой сигнальной системе и ее нарушениях при иммунной патологии. Часть I. // Журнал аллергология. 2005, № 4, 25-28.
2. Byung-Hak K., Kwang-Min N., Ikhoon O., Inn-Hye S., Yun Sang L., Jongheon S., Tae-Yoon K. Kurarione regulates immune responses through regulation of the JAK/STAT and TCR-mediated signaling pathways. // J. Biochem. Pharm. – 2013. – Vol. 85 (8). – P. 1134-1144.
3. Hirota K., Martin B., Veldhoen M. Development, regulation and functional capacities of Th17 cells. // Semin. Immunopathol. 2010, 32 (1), 3–16.
4. Laddawan S., Veerapol K., Auemduan P., Upa K. Quercetin and EGCG Exhibit Chemopreventive Effects in Cholangiocarcinoma Cells via Suppression of JAK/STAT Signaling Pathway // J. Phytotherapy Research – 2014. – Vol. 28 (6). – P. 841-848.
5. Yu ES, Min HJ, An SY, Won HY, Hong JH, Hwang ES. Regulatory mechanisms of IL-2 and IFN $\gamma$  suppression by quercetin in T-helper cells. // J. Biochem. Pharm. – 2008. – Vol. 76 (1). – P. 70-78.

### IMPACT OF CHEMICALLY MODIFIED FLAVONOID ON SECRETORY ACTIVITY OF MITOGEN- ACTIVATED MONONUCLEAR CELLS

Laptev O. S., Albegova D. Z., Pavlova S. I., Kenkischvili A. O.,  
Kyagova A. A., Kozlov I. G.

Currently, in treating autoimmune diseases used several classes of drugs, mostly – glucocorticosteroids, cytostatics, calcineurin inhibitors and specific monoclonal antibody. In the appointment of therapy groups corticosteroids and cytotoxic drugs there is a number of significant side effects associated with the mechanism of action of these groups of drugs. The groups of drugs calcineurin inhibitors and monoclonal antibodies have significantly fewer serious side effects, however, to preparations of such groups quite quickly develop resistance and the cost of production of these substances (proteins), and the drugs themselves is high. Therefore it seems interesting to study class of flavonoids and their chemical modifications, by the mechanism of inhibition of intracellular signaling molecules some families such as JAK, TYK and STAT leading to «switching» of the immune response. The present study showed the likely impact of the test agent on the «switching» of the immune response.

**Раздел 5**  
**ИММУНОЛОГИЯ РЕПРОДУКЦИИ**  
**И ОНТОГЕНЕЗА**

## ОСОБЕННОСТИ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ В-ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ И ПЕРИТОНЕАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ ПРИ ЭНДОМЕТРИОЗЕ

Абдуллаева Л. Х., Анциферова Ю. С., Малышкина А. И.,  
Красильникова А. К.

ФГБУ «Ивановский НИИ материнства и детства им. В. Н. Городкова»  
Минздрава России, Иваново, Россия

В периферической крови и перитонеальной жидкости пациенток с эндометриозом выявлено снижение уровня В-клеток памяти, регуляторных В-лимфоцитов и повышение количества наивных В-лимфоцитов и уровня CD86-позитивных клеток в пуле CD19+ лимфоцитов. Изменения фенотипа лимфоцитов в перитонеальной жидкости пациенток с эндометриозом прямо коррелировали со стадией заболевания.

*Ключевые слова:* эндометриоз, В-лимфоциты, дифференцировка.

Эндометриоз – это широко распространенное гинекологическое заболевание, характеризующееся присутствием эндометриальной ткани вне мест ее нормального расположения, преимущественно в перитонеальной полости. По мнению многих авторов эндометриоз имеет аутоиммунную природу [1]. У женщин с эндометриозом выявлены многие симптомы, характерные для классического аутоиммунного заболевания, такие как поликлональная В-клеточная активация, усиленный апоптоз, тканевое повреждение и мульти-органное вовлечение [1]. Данные о наличии семейной предрасположенности к развитию эндометриоза также подтверждают гипотезу об аутоиммунной природе этого заболевания [2]. Считают, что наиболее ярким проявлением аутоиммунных нарушений при эндометриозе является усиленная продукция аутоантител различной природы у пациенток [1]. Однако вопрос о значимости этих аутоантител в патогенезе эндометриоза до конца не решен. Многие исследователи не находят взаимосвязи между титром аутоантител и стадией эндометриоза [1]. Вероятно, этот факт может быть связан с тем, что при многих аутоиммунных заболеваниях, таких как СКВ, диабет, и др. выработка аутоантител предшествует развитию клинических симптомов и может существенно снижать-

ся по мере прогрессирования патологии [1]. В то же время, до сих пор остаются мало изученными механизмы функционирования В-клеток при эндометриозе. Показано, что в сыворотке пациенток с эндометриозом повышено содержание фактора, стимулирующего активность В-лимфоцитов – BlyS [3]. Но литературные данные об особенностях фенотипа и функциональной активности В-лимфоцитов у пациенток с эндометриозом практически отсутствуют. В связи с этим, **целью нашей работы** было выявить особенности содержания В-лимфоцитов, находящихся на разных стадиях дифференцировки, в периферической крови и перитонеальной жидкости пациенток с эндометриозом различной степени тяжести для уточнения механизмов развития аутоиммунных нарушений при этом заболевании.

В исследование были включены 43 женщины, поступившие в гинекологическую клинику на оперативное лечение по поводу бесплодия (основная группа). Всем пациенткам была проведена лечебно-диагностическая лапароскопия, в ходе проведения которой у 28 женщин был диагностирован эндометриоз I–II стадии, у 15 женщин – эндометриоз III–IV стадии по классификации ASF. Показатели иммунологического обследования 9 здоровых фертильных женщин, поступивших

на хирургическую стерилизацию, использовались в качестве контроля. Материалом для исследования служила периферическая кровь и перитонеальная жидкость. Выделение обогащенной популяции моноклеарных клеток крови и перитонеальной жидкости осуществляли стандартным методом скоростного центрифугирования в градиенте плотности фиколл-урографина. Фенотип В-лимфоцитов крови и перитонеальной жидкости определяли с помощью моноклональных антител методом многоцветной проточной цитометрии на цитометре FACSCanto II. В ходе исследования оценивалось общее содержание CD20<sup>+</sup> и CD19<sup>+</sup> лимфоцитов, в популяции CD19<sup>+</sup> лимфоцитов определялось относительное содержание CD38<sup>+</sup>CD20<sup>-</sup> (плазматические клетки), CD27<sup>+</sup> (В-клетки памяти), CD27<sup>-</sup> (наивные В-лимфоциты), IL-10<sup>+</sup> (регуляторные В-лимфоциты) и CD86<sup>+</sup> клеток.

В целом содержание В-лимфоцитов в периферической крови и перитонеальной жидкости пациенток с эндометриозом не отличалось от такового у здоровых женщин. При анализе субпопуляционного состава В-лимфоцитов нами было установлено, что в периферической крови пациенток с эндометриозом различной степени тяжести было снижено содержание В-клеток памяти (CD27<sup>+</sup>) и повышен уровень наивных В-лимфоцитов (CD27<sup>-</sup>). Кроме того, у всех женщин основной группы в крови было повышено содержание плазматических клеток и CD86-позитивных В-лимфоцитов, но снижено количество регуляторных IL-10<sup>+</sup> В-лимфоцитов по сравнению с показателями у здоровых женщин. Взаимосвязи выраженности изменений популяционного состава периферических В-лимфоцитов со степенью тяжести эндометриоза нами не отмечалось. В перитонеальной жидкости пациенток основной группы изменения фенотипа В-лимфоцитов в целом соответствовали тем особенностям, которые были выявлены в периферической крови при эндометриозе. Уровень перитонеальных наивных В-клеток, плазматических клеток и CD86<sup>+</sup> В-лимфоцитов при эндометриозе был повышен, тогда как содержание В-клеток памяти и регуляторных IL-10<sup>+</sup> В-лимфоцитов было значительно снижено, по сравнению с показателями у контрольной группы. В отличие от показателей периферической крови, в перитонеальной жидкости практически все изменения фенотипа В-лим-

фоцитов прямо коррелировали со степенью тяжести эндометриоза и в максимальной степени проявлялись при эндометриозе III–IV стадии.

Таким образом, полученные нами результаты позволяют говорить об изменении характера дифференцировки В-лимфоцитов при эндометриозе. Снижение уровня В-клеток памяти ассоциировалось с чрезмерным повышением количества плазматических клеток на фоне снижения активности регуляторных В-лимфоцитов, как на системном, так и на локальном уровне у пациенток с эндометриозом. Вероятно, именно высокое содержание плазматических клеток может определять повышение продукции аутоантител при эндометриозе. Один из механизмов, ведущих к нарушению дифференцировки В-клеток при данном заболевании, может быть выявлен нами при снижении активности пула регуляторных В-лимфоцитов, продуцирующих внутриклеточно IL-10. Наши результаты согласуются с данными других авторов, показавших, что снижение уровня регуляторных В-лимфоцитов ассоциировано с развитием целого ряда аутоиммунных заболеваний, таких как ревматоидный артрит, СКВ и др. [4]. Кроме того, выявленное нами повышение количества CD86-позитивных клеток в пуле В-лимфоцитов у пациенток с эндометриозом, также может быть связано с повышенной продукцией аутоантител, поскольку имеются данные о том, что при воздействии на В-лимфоциты анти-CD86-антител ингибируется продукция поликлональных Ig у пациенток с СКВ [5]. Выявленная нами корреляция выраженности нарушений дифференцировки В-лимфоцитов перитонеальной жидкости со стадией эндометриоза позволяют говорить о непосредственной взаимосвязи этих нарушений с иммунными механизмами формирования и развития эндометриозных очагов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Eisenberg V. H., Zolti M., Soriano D. Autoimmunity Reviews. 2012, 11, 806-814.
2. Sundqvist J., Falconer H., Seddighzadeh M. Fertil Steril. 2011, 95, 437-40.
3. Hever A., Roth R. B., Hevezi P., et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007, 104 (30), 12451–12456.
4. Li X., Braun J., Wei B. Autoimmunity. 2011, 44 (1), 58-68.
5. Nagafuchi H., Shimoyama Y., Kashiwakura J., et al. Clin Exp Rheumatol. 2003, 21 (1), 71-77.

## THE CHARACTER OF DIFFERENTIATION OF PERIPHERAL BLOOD AND PERITONEAL FLUID B-LYMPHOCYTES IN ENDOMETRIOSIS

L. H. Abdullaeva, Yu. S. Antsiferova, A. I. Malyshkina,  
A. K. Krasilnikova

*V. N. Gorodkov Federal State Research Institute of Maternity and Childhood, Ivanovo, Russia*

The decrease of the level of memory B-cells, regulatory B-lymphocytes and the elevation of the naïve B-lymphocytes and the amount of CD86-positive cells in the pool of CD19<sup>+</sup> lymphocytes of peripheral blood and peritoneal fluid of women with endometriosis were found. Changes of the lymphocytes phenotype in the peritoneal fluid are corresponded to the severity of the disease.

## ИЗУЧЕНИЕ ЗАКОНОМЕРНОСТЕЙ ИММУНОМОДУЛЯЦИИ ОРИЕНТИРОВОЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОГО ПОВЕДЕНИЯ МЫШЕЙ (СВАхС57BL/6) F1 В ПРОЦЕССЕ ОНТОГЕНЕЗА

Аникеева О. С., Абрамова Т. Я.

*Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии»,  
Новосибирск, Россия*

Многokратный перенос иммунокомпетентных клеток от взрослых животных с определенным уровнем ОИП сингенным неполовозрелым реципиентам в ювенильный период развития определяет у реципиентов вектор взаимодействия нервной и иммунной систем. При этом направление развития указанных систем находятся в различной зависимости от количества трансплантируемых клеток.

*Ключевые слова:* иммунокомпетентные клетки, высшая нервная деятельность, онтогенез.

**Актуальность.** Известно, что формирование поведения незрелорожденных животных в постнатальный период является результатом сложного взаимодействия между организмом и средой. С точки зрения эпигенетики, факторы внешней среды не просто поддерживают развитие, а активно участвуют в определении самой структуры и организации каждой из реактивных систем организма [4].

Исходя из положения о структурно-функциональном единстве иммунной и нейроэндокринной систем [1], были проведены эксперименты по изменению уровня ориентировочно-исследовательского поведения (ОИП) и состояния иммунной системы животных-реципиентов в результате трансплантации иммунокомпетентных клеток (ИКК) от сингенных доноров с определенным уровнем ОИП [5].

В наших исследованиях было установлена возможность целенаправленного формирования уровня поведенческой активности мышей (СВАхС57BL/6) F1 в ювенильный период развития (с 4-5 до 10-12 недели жизни) посредством многократного сингенного переноса ИКК от взрослых животных с различным уровнем ОИП. Были определены зависящие от характеристик трансплантируемых клеток особенности функционального состояния иммунной системы и поведенческой активности животных, сформировавшиеся в указанных условиях [2].

**Целью** настоящего исследования являлся анализ особенностей поведенческой активности и иммунной системы животных, формирующихся в условиях многократного переноса разных доз клеток от сингенных животных с определенным уровнем ОИП.



**Методы.** Исследование выполнено на 899 мышцах-самцах гибридах первого поколения (CBAxС57BL/6)F1 различного возраста, 469 из которых составили группу «доноры» (379 мышей 3-х месячного возраста и 90 мышей 4-5 недельного возраста) и 430 группу «реципиенты» 4-5 недельного возраста. Донорам и реципиентам (в 10-12 недель жизни) проводилось определение уровня (ОИП) в тесте «open field» с регистрацией: а) горизонтальной активности (периферической и центральной); б) вертикальной активности (пристеночные и свободные стойки); в) эмоционального напряжения [3]. По характеру поведения животные подразделялись на три группы: с высоким, средним и низким уровнем ОИП. Реципиентам с 4-5 недельного возраста проводилась трехкратная трансплантация спленоцитов (в/в, 5,0 и 10,0x10<sup>6</sup> клеток в 0,4 мл RPMI x 1 раз в неделю) от мышей 3х месячного возраста с высоким (группы 1) и низким (группа 2) уровнем ОИП, а также от мышей соответствующего реципиентам возраста (группа 3). Контрольной группе (группа 4) по аналогичной схеме вводилось 0,4 мл RPMI. Функциональная активность спленоцитов выявлялась в тесте спонтанной, а также Con-A (Pharmacia Fine Chemicals, в концентрации 3 мкг/мл) и LPS (DIFCO LABORATORIES, в концентрации 5 мкг/мл) индуцированной пролиферации. Пролиферативную активность клеток оценивали через 48 часов по включению <sup>3</sup>H-тимидина в нуклеотидные фракции клеток.

Для статистической обработки данных использовалась компьютерная программа STATISTICA 6.0. Применялся критерий Манна-Уитни и точный метод Фишера. Данные представлены в форме M±SD.

**Результаты.** Было установлено, что в группах мышей, получавших в процессе развития разное количество (5,0 и 10,0 x10<sup>6</sup>) клеток от доноров аналогичного реципиентам возраста, а также от взрослых животных с низким уровнем ОИП, доли животных со сформировавшимся аналогичным уровнем поведенческой активности достоверно не различались. Значимое увеличение доли животных с высоким уровнем ОИП было определено в группе, получившей трансплантат в объеме 5,0 x 10<sup>6</sup> относительно группы, получившей 10,0 x10<sup>6</sup> клеток.

Не было выявлено значимых различий по отдельным характеристикам ориентировочно-исследовательского поведения в 2 груп-

пах животных, получавших разное количество клеток от доноров с низким уровнем ОИП. В 3 группах, выросших в условиях трехкратного переноса клеток от доноров аналогичного им возраста, было определено увеличение пристеночных стоек (6,96±6,4 vs. 4,5±3,4; p=0,02), а также суммарной вертикальной активности (7,6±7,4 vs. 5,1±4,1; p=0,04) в ответ на введение 5,0 x10<sup>6</sup> клеток относительно группы, получившей большую дозу ИКК, что свидетельствует о более выраженной активации исследовательской активности у данных животных. Наиболее выраженные различия в поведенческой активности между группами, различающимися по количеству вводимых клеток, были определены в 1-х группах, получавших клетки от доноров с высоким уровнем ОИП. В частности, более высокие показатели параметров горизонтальной (143,6±75,7 vs. 110,3±66,2; p=0,01) и вертикальной активности (8,8±6,5 vs. 5,9±4,7; p=0,005) были получены в ответ на меньшее количество трансплантируемых клеток. Следует отметить, что уровень эмоционального напряжения, определяемый по числу фекальных болюсов, не выявил различий между группами.

В процессе анализа функциональных показателей иммунной системы групп реципиентов, получивших клеточный трансплантат от доноров с определенным уровнем ОИП, была установлена прямая зависимость выраженности пролиферативной активности клеток реципиента от количества вводимых клеток донора. В частности, эта закономерность была характерна для 1-х опытных групп – при сравнении параметров Con-A индуцированной пролиферации в подгруппах, получивших дозу ИКК в количестве 5,0 и 10,0x10<sup>6</sup>, соответственно (15714,3±4877,7 vs. 27594,8±13937; p=0,0005). Во 2-х группах – не только для Con-A индуцированной (10454,9±4349,7 vs. 19233,1±6496,9; p=0,0001), но и спонтанной пролиферации (228,5±101,8 vs. 1482,1±1095; p=0,0001). Третьи группы реципиентов также достоверно различалась по параметрам LPS-индуцированной пролиферации (9345,6±686,2 vs. 15558,3±4447,4; p=0,008) при увеличении числа вводимых клеток.

Таким образом, формирование уровня поведенческой активности и пролиферативной активности ИКК у мышей (CBAxС57/Bl)F1, подвергшихся в процессе онтогенеза трехкратной трансплантации спленоцитов от взрослых сингенных животных с определенным уров-

нем ОИП и от доноров аналогичного реципиентам возраста, находятся в неодинаковой зависимости от вводимых доз. Полученные данные свидетельствуют как о наличии ответа, так и о различной чувствительности к эпигенетическим факторам со стороны нервной и иммунной систем.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абрамов В.В., Абрамова Т.Я., А.Ф. Повещенко и др. Руководство по функциональной межпо-

- лушарной асимметрии (коллектив авторов) // М. Научный мир, 2009, С. 274-302.
2. Аникеева О.С., Абрамова Т.Я., Козлов В.А. // Бюллетень сибирской медицины. – 2015. – том 14. – № 1. – С.5–11.
3. Буреш Я., Бурешова О., Хьюстон Д.П. Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения. М., 1991.
4. Соцкая М.Н. Зоопсихология и сравнительная психология. М: МГУ, – 2007. – 641 стр
5. Маркова Е.В., Абрамов В.В., Козлов В.А. //Успехи современной биологии. 2009; Т. 129, № 4. С. 348-355.

### INVESTIGATION OF IMMUNOMODULATION PATTERNS OF ORIENTING-INVESTIGATORY BEHAVIOR OF MICE (CBAx C57BL/6)F1 DURING THE ONTOGENESIS

Anikeeva O.S., Abramova T. Ya.

*Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russia*

Repeated transfer of immune cells from adult animals with a certain level of OIB to immature syngeneic recipients in the juvenile period determines the vector of interactions between their nervous and immune systems. Direction of the development of these systems differently depends on the number of transplanted cells.

### УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ *rag1* И *tdt* В ТИМУСЕ НА ФОНЕ ИММУНИЗАЦИИ

Васильев К.А.<sup>2,3</sup>, Полевщиков А.В.<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург; <sup>2</sup>Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург; <sup>3</sup>Дальневосточный федеральный университет, Владивосток, Россия

В работе приводятся данные анализа уровня экспрессии генов *rag1* и *tdt* в тимусе мышей на фоне иммунизации. Показана способность тимоцитов отвечать на введение антигена повышением экспрессии генов, отвечающих за реаранжировку Т-клеточных рецепторов. Установлено, что предварительная стимуляция фагоцитирующих клеток мышей полимерным декстраном за 72 ч до иммунизации приводит к ускорению ответа тимоцитов на антигенную стимуляцию. Выдвигается гипотеза о влиянии иммунизации на процесс формирования рецепторов Т-клеток и существовании антиген-зависимого этапа дифференцировки Т-лимфоцитов.

*Ключевые слова:* тимус, иммунизация, реаранжировка, гематотимический барьер.

**Актуальность и цель работы.** Тимус выполняет функцию центрального органа иммунной системы, отвечающего за дифференцировку, селекцию и созревание Т-лимфоцитов. Данный процесс предполагает прохождение клеткой нескольких «контрольных точек», на кото-

рых оценивается функциональная активность ее антиген-распознающих рецепторов, а также выявляются аутореактивные клоны, которые подвергаются элиминации в ходе негативной селекции [1]. Долгое время господствовала гипотеза об антиген-независимом характере

процесса дифференцировки Т-лимфоцитов, базирующаяся на данных о наличии гематимического барьера. Однако углубленный анализ литературы позволяет заключить, что данная структура проницаема как для растворимых антигенов, так и для крупных частиц, таких как бактерии и вирусы [2]. Более того, в настоящее время известна достаточно обширная группа патогенов, для которых показано целенаправленное проникновение в тимус [3]. Установлено, что интратимические инфекции способны значительным образом менять структуру и функциональную активность органа. Стандартной реакцией тимуса на заражение является атрофия, которая может быть спровоцирована также системным действием патогена, связанным с усилением продукции глюкокортикоидов и провоспалительных медиаторов, запускающих процесс апоптоза преимущественно среди представителей DP- популяции. В связи с этим целесообразной становится постановка вопроса о влиянии ксеноантигенов, проникающих в тимус, на процесс созревания Т-лимфоцитов. Особенную важность приобретают исследования процесса реаранжировки Т-клеточного рецептора (TCR), происходящего на фоне иммунизации, так как именно молекулярный комплекс TCR обеспечивает основные аспекты функционирования зрелых Т-лимфоцитов. Известно, что генетическая реаранжировка TCR обеспечивается в основном ферментами RAG и TdT [4]. Следует отметить, что экспрессия генов *rag1* и *tdt* в тимусе осуществляется только в развивающихся Т-лимфоцитах, но не в клетках стромы. Реаранжировка  $\beta$ -цепи TCR происходит на стадиях DN2-3, в то время как реаранжировка  $\alpha$ -цепи TCR носит отложенный характер и осуществляется фактически при переходе от DP- к SP-тимоцитам. Повышение экспрессии данных генов указывает на формирование новых TCR, поэтому целью данной работы была оценка уровня экспрессии генов *rag1* и *tdt* в клетках тимуса мыши в ответ на иммунизацию.

**Материалы и методы.** В работе использовали самок белых нелинейных мышей массой тела 19-23 г в возрасте 8-10 недель. Животных содержали в стандартных условиях вивария без ограничений в доступе к воде и корму. Работу с животными проводили в соответствии с правилами комиссии по биоэтике НИИ экспериментальной медицины РАН.

Мыши были разделены на две группы. Группу 1 иммунизировали внутрибрюшинно фетальной бычьей сывороткой в объеме 0.1 мл, контрольные животные получали равный объем физиологического раствора (0.14 М раствор NaCl). Все животные группы 2 за 72 ч до опыта получали внутрибрюшинно 1 мл 1%-го раствора декстрана (М.м. 60-80 кДа, "Valeant Pharmaceuticals International", США) в качестве адъюванта с последующей иммунизацией по указанной схеме. Животных выводили из опыта ежедневно в течение 6 сут. после иммунизации путем декапитации и извлекали тимус. Число животных по каждой точке в опытных и контрольных группах было равным 4.

Оценка уровня экспрессии генов проводилась методом ПЦР с обратной транскрипцией. Выделение РНК, постановку реакции обратной транскрипции и ПЦР проводили при помощи реагентов Extract RNA ("Евроген", Россия), MMLV RT kit ("Евроген", Россия), набора для ПЦР-РВ ("Синтол", Россия). Для подбора праймеров использовали программу Primer3 (Whitehead Institute for Biomedical Research, США). В качестве внутреннего стандарта использовали мРНК  $\beta$ -актина. Уровень экспрессии генов "интереса" (ГИ) в опытных группах по сравнению со своим контролем рассчитывали по формуле  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , где  $\Delta\Delta Ct = [Ct_{ГИ}(\text{опыт}) - Ct_{\beta-act}(\text{опыт})] - [(Ct_{ГИ}(\text{контроль}) - Ct_{\beta-act}(\text{контроль}))]$  с вычислением среднего по 4 повторам.

**Результаты.** В результате проведенных исследований установлено, что уровень экспрессии генов *rag1* и *tdt* у животных 1 группы возрастает в 2-2,5 раза через 3 сут после иммунизации, а к 6 сут. приближается к уровню контроля (1,0).

У второй группы на 2 сут происходит усиление экспрессии обоих генов в 2 раза, затем постепенное снижение, а на более поздних сроках (4-5 сут) – выравнивание показателей. Полученные для группы 2 данные свидетельствуют о сходной динамике экспрессии генов *rag1* и *tdt* после иммунизации с предварительным введением декстрана, однако наибольших и наименьших значений данные показатели в группе 2 принимают на 1 сут раньше, чем в опытной группе 1.

Эти результаты указывают на изменение экспрессии генов *rag1* и *tdt* в тимусе в ответ на антигенную стимуляцию, что согласует-

ся с литературными данными о способности тимуса отвечать на введение ксеноантигена и дает основания предполагать, что процесс формирования TCR включает два этапа: антиген-независимый, связанный с протекающей в более изолированном кортексе реаранжировкой  $\beta$ -цепи, и антиген-зависимый, протекающий на кортикально-медуллярной границе или в медулле и связанный с реаранжировкой  $\alpha$ -цепи. В рамках этой гипотезы процесс селекции Т-лимфоцитов в отношении некоего абстрактного аутоантигена сменяется на процесс направленной селекции TCR в отношении конкретного ксеноантигена и выделении нового – антигензависимого – этапа дифференцировки Т-клеток.

В целом, можно заключить, что предшественники Т-лимфоцитов отвечают на введение ксеноантигена повышением экспрессии генов *rag1* и *tdt*, при этом предварительная стимуляция фагоцитов введением раствора

декстрана ускоряет этот процесс. Не исключено, что полученные результаты могут привести к существенной корректировке представлений о процессе созревания и дифференцировки Т-лимфоцитов и иммунофизиологии тимуса в целом.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы № 1326 и гранта 14-08-06-25\_и Дальневосточного федерального университета и гранта РФФИ № 15-04-05093а.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Васильев К. А., Полевщиков А. В. Онтогенез 2015, 46 (3), 1–12.
2. Васильев К. А., Полевщиков А. В. Биология моря 2014, 40 (5), 331–341.
3. Nunes-Alves C., Cláudia N. Trends in Immunol 2013, 34, 502–510.
4. Gellert M. Annu Rev Biochem 2002, 71, 101–132.
5. Boehmer H., Aifantis I. et al. Immunol Rev 1998, 165, 111–119.

### RAG1 AND TDT EXPRESSION LEVEL IN THYMUS AFTER IMMUNIZATION

Vasiliev K. A.<sup>2,3</sup>, Polevshchikov A. V.<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Institute of Experimental Medicine, Saint-Petersburg; <sup>2</sup>Saint-Petersburg State University; Saint-Petersburg; <sup>3</sup>Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russia

The data of the RT-PCR-based study of *rag1* and *tdt* expression level gives evidence that thymus responds to the intraperitoneal immunization of mice with the fetal bovine serum. The existing data of general ability of thymus to respond to the antigen stimulation were reconfirmed. The experimental proofs of the changes in the expression level of *rag1* and *tdt* were obtained for the first time. The preliminary stimulation of animals with the polymeric dextran 72 h before the immunization accelerates the thymocyte response. We hypothesize that the antigen stimulation influences the process of the TCR generation and that some stages of T-cell differentiation occur in the antigen depending manner.

## ПОКАЗАТЕЛИ АДАПТИВНОГО ИММУНИТЕТА В ПЕРВОМ ТРИМЕСТРЕ БЕРЕМЕННОСТИ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ЕЕ ИСХОДА

Газиева И. А., Чистякова Г. Н., Ремизова И. И.

ФГБУ «НИИ ОММ» Минздрава России, Екатеринбург, Россия

С целью определения особенностей экспрессии мембранных антигенов лимфоцитов периферической крови в первом триместре беременности в зависимости от ее исхода проведено иммунологическое обследование 210 женщин. Ранние сроки беременности, прервавшейся в I триместре, характеризуются снижением доли Т-хелперов и увеличением содержания мембраносвязанных форм молекул межклеточной адгезии CD54. В первом триместре беременности, осложненной впоследствии субкомпенсированной плацентарной недостаточностью, имеет место угнетение экспрессии маркеров, ассоциированных с позитивной активацией клеток (CD71) и иммунным распознаванием антигенов плода (HLA-DR), нарушение формирования иммунологической толерантности (тенденция к снижению количества регуляторных Т-клеток) на фоне уменьшения численности CD3<sup>+</sup>-лимфоцитов, экспрессирующих маркер готовности к апоптозу CD95.

*Ключевые слова:* ранние сроки беременности, показатели клеточного иммунитета, гестационные осложнения, прерывание беременности.

В последнее время ведущая роль в изучении механизмов иммуномодуляции и формирования иммунологической толерантности в ходе материнско-фетальных взаимодействий принадлежит расширению представлений о полноценности процессов дифференцировки, активации, апоптоза иммунокомпетентных клеток, иммунного распознавания аллоантигенов плодового происхождения и межклеточного взаимодействия [1, 2]. Если еще несколько лет назад исследования в области иммунологии репродукции были связаны с доказательством вовлеченности в патогенез того или иного патологического состояния различных иммунологических параметров и определением так называемого «иммунологического профиля» осложнений, то сегодня вектор научного поиска задан в направлении прогнозирования нарушений физиологического течения беременности с использованием иммунологических показателей с ранних сроков беременности [3, 4]. В связи с этим оценка уровня экспрессии мембранных рецепторов с использованием технологии иммунофенотипирования имеет большое значение для определения дополнительных факторов риска реализации гестационных осложнений и невынашивания беременности.

**Цель:** определение особенностей экспрессии мембранных антигенов лимфоцитов периферической крови в первом триместре беременности в зависимости от ее исхода.

**Пациенты и методы.** Проведено иммунологическое обследование 210 женщин в первом триместре прогрессирующей беременности, а также исходов гестации. В ходе ретроспективного исследования в зависимости от характера течения беременности сформированы следующие группы: 1-я основная группа – 60 женщин, беременность которых осложнилась субкомпенсированной плацентарной недостаточностью (ПН) и закончилась рождением живых детей; 2-я основная группа – 38 женщин, беременность которых прервалась в первом триместре по типу неразвивающейся беременности или раннего выкидыша. Группу сравнения (3-ю) составили 112 женщин, беременность которых протекала без признаков плацентарной недостаточности и закончилась рождением живых доношенных детей. Иммунофенотипирование лимфоцитов осуществляли методом проточной лазерной цитофлуориметрии на анализаторе «FACS Calibur» фирмы «Becton Dickinson» (США) с использованием наборов моноклональных антител того же производителя. Статистическую об-

работку полученных результатов проводили с использованием пакета прикладных программ «Statistica 6.0», проверку статистических гипотез осуществляли с помощью непараметрического U-критерия Манна-Уитни. Данные представляли в виде медианы (Me) и нижнего и верхнего квартилей (25-го и 75-го процентилей), уровень значимости различий (p) с учетом поправки Бонферрони принимали равным 0,025; при  $0,05 < p < 0,025$  констатировали тенденцию к изменению параметров.

**Основные результаты.** Установлено, что ранние сроки беременности женщин основных групп характеризуются неполноценностью активирующего сигнала, который является обязательным условием запуска фетопротективных механизмов. В группе женщин с прерыванием беременности в I триместре зарегистрировано уменьшение относительного содержания Т-хелперов (38 (36–44)% против 44 (38–48)%,  $p_{2-3}=0,015$ ). При оценке уровня экспрессии мембранных активационных антигенов в ранние сроки беременности, осложнившейся впоследствии субкомпенсированной ПН, выявлено уменьшение относительного и абсолютного содержания CD3<sup>+</sup>-лимфоцитов, экспрессирующих рецептор трансферрина CD71 (3,5 (1–5)% против 5 (3–7)%,  $p_{1-3}=0,007$  и 0,06 (0,02–0,12)×10<sup>9</sup>/л против 0,11 (0,07–0,16)×10<sup>9</sup>/л,  $p_{1-3}<0,001$  соответственно), снижение количества Т-лимфоцитов, экспрессирующих маркер готовности к апоптозу CD95 (0,16 (0,07–0,24)×10<sup>9</sup>/л против 0,20 (0,12–0,31)×10<sup>9</sup>/л,  $p_{1-3}=0,017$ ), снижение доли и общей численности CD25<sup>+</sup>-лимфоцитов (6 (4–10)% против 8 (5–12)%,  $p_{1-3}=0,02$  и 0,12 (0,09–0,23)×10<sup>9</sup>/л против 0,19 (0,13–0,26)×10<sup>9</sup>/л,  $p_{1-3}=0,022$ ), тенденция к уменьшению как относительного, так и абсолютного содержания регуляторных CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>Foxp3<sup>+</sup>-клеток (4,5 (3–7)% против 6 (4–10)% и 0,08 (0,06–0,19)×10<sup>9</sup>/л против 0,174 (0,08–0,2)×10<sup>9</sup>/л,  $p_{1-3}=0,034$  в обоих случаях), а также количества Т-лимфоцитов, экспрессирующих поздний маркер активации HLA-DR (0,05 (0,01–0,08)×10<sup>9</sup>/л против 0,06 (0,04–0,09)×10<sup>9</sup>/л,  $p_{1-3}=0,027$ ). Выявленное в результате проведенных исследований снижение количества CD25- и CD71-позитивных лимфоцитов, сопровождающееся уменьшением содержания Т-клеток, потенциально способных вступить в апоптоз, в ранние сроки беременности, осложненной впоследствии среднетяжелой формой ПН, свидетельствует

о нарушении основных механизмов поддержания гомеостаза: процессов активации иммунокомпетентных клеток и элиминации потенциально опасных эффекторных клонов лимфоцитов. Определение уровня экспрессии мембраносвязанных маркеров межклеточного взаимодействия показало, что, несмотря на то, что при беременности, прервавшейся в I триместре, процент CD54<sup>+</sup>-лимфоцитов не отличался от аналогичного показателя в группе сравнения, общая численность этой популяции клеток была практически в 1,5 раза выше: 0,74 (0,41–0,88)×10<sup>9</sup>/л против 0,51 (0,33–0,74)×10<sup>9</sup>/л, ( $p_{2-3}=0,014$ ). Выявленная в этой группе избыточная экспрессия мембранной молекулы адгезии ICAM-1 свидетельствует об усилении сродства лейкоцитов с эндотелием и является индикатором нарушения информационного обмена на уровне межклеточной коммуникации.

**Заключение.** Нарушение клеточно-опосредованных механизмов регуляции гестационного процесса на доклиническом этапе ранних репродуктивных потерь характеризуется снижением относительного содержания Т-хелперов, а также увеличением содержания мембраносвязанных форм молекул межклеточной адгезии. В первом триместре беременности, осложненной впоследствии среднетяжелыми формами плацентарной недостаточности, имеет место отсутствие полноценного активирующего сигнала (угнетение экспрессии маркеров, ассоциированных с позитивной активацией клеток, иммунным распознаванием антигенов плодового происхождения), нарушение формирования иммунологической толерантности (тенденция к снижению количества регуляторных Т-клеток) на фоне уменьшения численности CD3<sup>+</sup>-лимфоцитов, экспрессирующих маркер готовности к апоптозу CD95.

Работа поддержана Грантом РФФИ и РФФИ-Урал № 13-04-96080.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Сухих Г.Т., Ванько Л.В. Акушерство и гинекология. 2012. № 1. С. 128–136.
2. Saito S., Nakashima A., Shima T., Ito M. Am. J. Reprod. Immunol. 2010. Vol. 63, № 6. P. 601–610.
3. Warning J.C., Mc Cracken S.A., Morris J.M. Reproduction. 2011. Vol. 141, № 6. P. 715–724.
4. Quenby S., Nik H., Innes B. Hum. Reprod. 2009. Vol. 24, № 1. P. 45–54.

## THE PARAMETERS OF ADAPTIVE IMMUNITY IN THE FIRST TRIMESTER OF PREGNANCY DEPENDING ON THE OUTCOMES

Gazieva I. A., Chistyakova G. N., Remisova I. I.

*Mother and Child Care Ural Research Institution of Russia Public Health Ministry,  
Yekaterinburg, Russia*

To evaluate the features of the expression of membrane antigens of peripheral blood lymphocytes in the first trimester of pregnancy depending on the outcome 210 women were surveyed. Early pregnancy, interrupted in the first trimester, was characterized by a decrease in the percentage of T-helpers and an increase in the number of membrane-bound forms of intercellular adhesion molecules CD54. In the first trimester of pregnancy, complicated subsequently by subcompensated placental insufficiency there was an inhibition of the expression of markers associated with a positive activation of cells (CD71) and immune recognition of fetal antigens (HLA-DR), impaired formation of immunological tolerance (the tendency to decrease the number of regulatory T-cells) and also the reduction in the number of CD3<sup>+</sup>-lymphocytes expressing the marker ready to apoptosis CD95.

---

---

## ЭКСЦИЗИОННЫЕ КОЛЬЦА ГЕНОВ АЛЬФА-ЦЕПИ Т-КЛЕТОЧНОГО РЕЦЕПТОРА КАК ПАРАМЕТР ОЦЕНКИ ИММУННОГО СТАТУСА ВЗРОСЛЫХ ЛИЦ

Головизнин М. В.<sup>1</sup>, Лахонина Н. С.<sup>1</sup>, Донецкова А. Д.<sup>2</sup>,  
Никонова М. Ф.<sup>2</sup>, Булдакова Ю. Р.<sup>1</sup>, Грошев И. А.<sup>4</sup>,  
Кошкина Е. В.<sup>5</sup>, Тимофеев В. Т.<sup>3</sup>

*<sup>1</sup>ГБОУ ВПО МГМСУ имени А. И. Евдокимова; <sup>2</sup>ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России; <sup>3</sup>ГБОУ ВПО РНИМУ имени Н. И. Пирогова; <sup>4</sup>Городская онкологическая больница № 62; <sup>5</sup>ГКБ № 67 имени Л. А. Ворохобова, Москва, Россия*

Эксцизионные кольца реаранжировки генов альфа-цепи Т-клеточного рецептора (ТРЭК) являются показателями дифференцировки Т-клеток в тимусе и могут быть использованы для оценки функции тимуса у детей. Как показано в настоящей работе, ТРЭК у взрослых также могут быть использованы для оценки иммунного статуса в норме и патологии. У доноров, больных ревматоидным артритом, острым инфарктом миокарда, онкозаболеваниями ЖКТ выявлена достоверная обратная корреляция с возрастом, более выраженная при онкопатологии. В популяции «недавних тимических эмигрантов» CD4<sup>+</sup>31<sup>+</sup> уровень ТРЭК не зависел от возраста больных. Выявлены также взаимосвязи между уровнем ТРЭК и экспрессией CD4, ТРЭК и уровнем С-реактивного белка. Тем самым, ТРЭК могут быть использованы как параметр оценки иммунного статуса у взрослых в норме и при патологии.

*Ключевые слова:* иммунограмма, тимус, недавние тимические эмигранты.

Лабораторная оценка иммунного статуса на протяжении последних десятилетий постоянно пополняется новыми компонентами. Общее число иммунологических показателей, находящееся в поле зрения клинических иммунологов, в настоящее время колеблется в пределах 1-2 сотен, что не только уточняет, но и сильно усложняет анализ иммунограм-

мы, делая его малодоступным для врачей-практиков. Кроме того, в оценке иммунных показателей наблюдается значительный «перекос» в сторону «иммунной периферии» – клеток крови и их продуктов, тогда как определение функции центральных органов иммунной системы, в частности тимуса, до недавнего времени оставалось вне поля зрения исследова-

дователей. В последнее время появился метод оценки функции тимуса «*in vivo*» с помощью т.н. Т-рецепторных эксцизионных колец (ТРЭК) – эпизомальных фрагментов ДНК, образующихся при реаранжировке генов альфа-цепи Т-клеточного рецептора (T-cell receptor excision circles, TREС). В процессе деления вышедших из тимуса Т-лимфоцитов ТРЭК не подвергаются делению и в периферической популяции Т-клеток их количество уменьшается прямо пропорционально интенсивности клеточного размножения. Считается, что высокое содержание ТРЭК свойственно лишь Т-клеткам, недавно вышедшим из тимуса, т.н., «недавним тимическим эмигрантам» (Recent thymic emigrants – RTE). У младенцев, детей и подростков уровень ТРЭК в лимфоцитах высок. Это послужило основанием для использования ТРЭК при оценке результатов неонатальной тимэктомии [1]. Однако, факты свидетельствуют, что у взрослых лиц, даже у пожилых, уровень ТРЭК в лимфоцитах крови поддается определению, хотя, он в разы меньше, чем таковой у детей [2]. Вышесказанное актуализирует вопрос включения ТРЭК в число показателей иммунного статуса для характеристики функции тимуса у взрослых.

**Цели работы:** проанализировать уровень ТРЭК у доноров разных возрастных групп и у больных с патологией иммунной системы, оценить достоверность и силу взаимосвязей между ТРЭК и другими клинико-иммунологическими параметрами и разработать подход к оценке уровня TREС в Т-лимфоцитах, имеющих фенотип RTE.

**Материалы и методы.** Было обследовано 180 человек, из них 56 практически здоровых лиц, 78 больных ревматоидным артритом (РА), 30 больных с острым инфарктом миокарда (ОИМ), 16 пациентов с хроническими формами ИБС: кардиосклероз, стенокардия напряжения II–III ФК (ИБС), 11 пациентов с опухолевым поражением желудочно-кишечного тракта (рак желудка, рак толстой кишки), имеющих отдаленные метастазы. Клинико-лабораторное обследование включало в себя, в частности, общий анализ крови, уровень глюкозы, С-реактивного белка, АСТ, АЛТ. Фенотип лимфоцитов крови изучался методом проточной цитометрии с использованием МонАТ к маркерам CD3, CD4, CD8, CD38, HLADR, определение уровня TREС производилось с помощью ПЦР. Фракционирование

лимфоцитов с целью обогащения их субпопуляцией CD4<sup>+</sup>CD31<sup>+</sup>-клеток производили путем двухэтапной магнитной сепарации при помощи магнитных бус Dynabeads Untouched Human CD4 T Cells и Dynabeads CD31 Endothelial Cell у 9 доноров. В основу фракционирования положено предварительное выделение CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов с помощью бус, нагруженных МонАТ к CD8, CD14, CD16, CD19, CD36, CD56, CDw123 и CD235a (отрицательная сепарация CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов), и последующим выделением CD31<sup>+</sup> из популяции CD4<sup>+</sup>-клеток (положительная сепарация CD31<sup>+</sup> Т-лимфоцитов). После магнитной сепарации в лимфоцитах определяли уровень ТРЭК методом ПЦР

**Результаты.** У всех лиц (n=117) нами выявлено снижение уровня ТРЭК по мере увеличения возраста обследуемых. Выявлена средней силы высоко достоверная обратная корреляция между возрастом и показателем ТРЭК (R=-0,726, p<0,001). Аналогичная закономерность связи возраста и уровня ТРЭК определялась в каждой группе обследуемых (за исключением больных ИБС) с некоторой вариативностью силы корреляционных взаимосвязей. У доноров (n=40) выявлена средней силы обратная корреляция между возрастом и показателем ТРЭК (R=-0,45944, p=0,002861). Сходная закономерность обнаружена у больных ОИМ (n=27), R=-0,522696505, при p=0,005155. В группе больных РА (n=25) также была выявлена средней силы обратная корреляция между возрастом и уровнем ТРЭК (R=-0,441744, p=0,027) У больных онкозаболеваниями (n=11) коэффициент корреляции ТРЭК-возраст составил: R=-0,701596 при p=0,016, что соответствует достоверной сильной обратной корреляции, при этом уровень TREС у больных онкопатологией (средний возраст 66 лет) был ниже чем в группе больных РА моложе 55 лет (p=0,000553) и в группе больных РА старше 55 лет (p=0,033896), приближаясь к таковому у пациентов ОИМ и ИБС, чей средний возраст был значительно выше [3]. В группе больных ИБС (n=12) достоверной корреляции между возрастом и ТРЭК выявлено не было (R=-0,216783, p=0,498556). При анализе взаимосвязи ТРЭК и мембранных маркеров лимфоцитов, вне зависимости от диагноза определялась средней силы прямая корреляция между ТРЭК и экспрессией CD4 (R=0,450198 p=0,001915) CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> (R=0,444599 p=0,003587) и обратная корреля-



ция ТРЭК и CD8 ( $R = -0,386751$   $p = 0,009505$ ). У больных РА была выявлена взаимосвязь Т ТРЭК и CD4 ( $R = 0,58681$   $p = 0,027384$ ), ТРЭК и популяции клеток CD3<sup>+</sup>4<sup>+</sup> ( $R = 0,445$ ,  $p = 0,004$ ). Примечательно, что корреляции ТРЭК с уровнем CD3 при РА обнаружено не было. Нами выявлена средней силы достоверная прямая корреляция ( $R = 0,434275204$ ,  $p = 0,008$ ) между уровнем С-реактивного белка и ТРЭК у больных РА и ОИМ. Также уровень ТРЭК коррелировал с содержанием АЛТ ( $n = 21$ ,  $R = 0,435123$ ,  $p = 0,048$ ), количеством эритроцитов ( $n = 19$ ,  $R = 0,642105$ ,  $p = 0,03$ ). Концентрация ТРЭК в Т-лимфоцитах CD4<sup>+</sup>31<sup>+</sup> и CD4<sup>+</sup>31<sup>-</sup> у здоровых лиц была различной. Средний уровень ТРЭК в CD4<sup>+</sup>31<sup>+</sup> клетках составил 0,057050 у.е. (нижний квартиль – 0,020750, верхний квартиль – 0,12250), в клетках CD4<sup>+</sup>31<sup>-</sup> – 0,006 у.е. (нижний квартиль – 0,0017, верхний квартиль – 0,00975). Нами была выявлена достоверная сильная обратная корреляция между возрастом и ТРЭК в Т-лимфоцитах CD4<sup>+</sup>31<sup>-</sup> (не RTE) ( $R = -0,898$ ,  $p = 0,002$ ). В то же время, уровень ТРЭК в CD4<sup>+</sup>31<sup>+</sup> RTE не коррелировал с возрастом испытуемых.

**Выводы и обсуждение:** 1) Уровень ТРЭК находится во взаимосвязи с клинико-иммунологическими параметрами доноров и больных. 2) У всех обследуемых лиц, как в норме, так и при патологии выявлено зависимое от возраста снижение уровня ТРЭК, что связа-

но с возрастным ослаблением функции тимуса, способным усугубляться под воздействием болезни. 2) У больных онкопатологией был выявлен самый низкий уровень ТРЭК и самая сильная обратная зависимость его от возраста пациентов. Вместе с тем, среди всех обследованных мы не выявили лиц с полным отсутствием ТРЭК. 3) В группе больных ИБС отсутствие возрастного снижения ТРЭК вероятно обусловлено самым пожилым возрастом пациентов. 4) В клетках CD4<sup>+</sup>31<sup>-</sup> происходило значимое снижение ТРЭК, связанное с возрастом, тогда как уровень ТРЭК во фракции CD4<sup>+</sup>31<sup>+</sup> (RTE) не зависел от возраста. Между ТРЭК и экспрессией CD4 выявлена прямая корреляция. 5) Прямая корреляция между ТРЭК и уровнем С-реактивного белка интересна в отношении оценки роли RTE в воспалении. Работа выполнена в рамках инициативного проекта № 14-04-32106, поддержанного грантом РФФИ

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Донецкова А. Д., Никонова М. Ф., Ваганов П. Д., и соавт. Иммунология № 4, 2014, С 204-209.
2. Головизнин М. В., Донецкова А. Д., Ярилин А. А. и соавт. Вестник уральской медицинской академической науки, 2010, 2/1 (29), С.26-27.
3. Головизнин М. В., Булдакова Ю. Р., Грошев И. А. Российский иммунологический журнал 2013, т. 7 (16), № 3 С. 194-195.

#### T-CELL RECEPTOR EXCISION CIRCLES AS A PARAMETER OF IMMUNE STATE EVALUATION OF ADULT PATIENTS.

Goloviznin M. V.<sup>1</sup>, Lakhonina N. S.<sup>1</sup>, Donetskova A. D.<sup>2</sup>, Nikonova M. F.<sup>2</sup>, Buldakova Yu. R.<sup>1</sup>, Groshev I. A.<sup>4</sup>, Koshkina E. V.<sup>5</sup>, Timofeev V. T.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Moscow State University of medicine and dentistry named after A. I. Evdokimov; <sup>2</sup>Scientific research center Institute of Immunology, Moscow; <sup>3</sup>Russian scientific research medical university named after N. I. Pirogov, Moscow; <sup>4</sup> Moscow municipal oncologic hospital № 62; <sup>5</sup> Moscow municipal hospital № 67 named after L. A. Vorokhobov, Moscow, Russia

T-cell receptor excision circles (TREC) are episoma-like products of TCR alfa-chain genes rearrangement. Its detection in T-lymphocytes gives evidence of thymic T-cells differentiation. TREC evaluation in children can estimate the effectiveness of neonatal thymectomy. As it was shown in present work. TREC level could be detected in adult patients. There are definite reverse correlations between TREC level and the age of donors and patients with rheumatoid arthritis, myocardial infarction and gastrointestinal metastatic tumors. In "recent thymic emigrants" CD4<sup>+</sup>31<sup>+</sup> TREC level doesn't depend on patients age. Positive correlations between TREC level, CD4 molecule expression and C-reactive protein were also evaluated. Thereby TREC could be used as a parameter of in vivo thymus function investigation in adult patients.

*Key words:* immunogramm, thymus, recent thymic emigrants.

## ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ КРИТЕРИИ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ВТОРИЧНОГО БЕСПЛОДИЯ

Жеребятъева О. О., Сетко Н. П., Михайлова Е. А., Киргизова С. Б.,  
Константинова О. Д., Кшнясева С. К., Махалова Г. О., Ляшенко И. Э.

ГБОУ ВПО «Оренбургский государственный медицинский университет»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Оренбург, Россия

Определен уровень интерлейкинов в отделяемом урогенитального тракта пациентов с латентным воспалением. Выявлены достоверные увеличения уровней ИЛ-1 $\beta$  и IFN- $\gamma$ , которые предложено использовать для прогнозирования развития бесплодия.

*Ключевые слова:* бесплодие, цитокины, прогнозирование.

Увеличение частоты бесплодных браков во всем мире обусловлено как женской, так и мужской инфертильностью [2]. Тревожная демографическая, социальная, медицинская ситуация диктует необходимость ее изучения. Вторичное бесплодие часто является следствием воздействия экологических, в том числе антропогенных, факторов, гормональных дисфункций, травм, а также воспалительных заболеваний микробной этиологии – уретритов, простатитов, эндоцервицитов и аднекситов. Латентное рецидивирующее течение воспалительных урогенитальных процессов, сохраняя субъективное благополучие, может привести к развитию бесплодия [3]. Патологические состояния мочеполового тракта часто связаны с участием в воспалительном процессе ассоциаций патогенных и условно-патогенных микроорганизмов. После проведения курса антибактериальной терапии воспаление может поддерживаться условно-патогенной микрофлорой с модифицированными свойствами. Отсутствие у пациентов специфического агента не позволяет ставить диагноз инфертильности микробной этиологии и, следовательно, вести поиск ранних признаков развития инфекционно-обусловленного нарушения репродуктивной функции. Вместе с тем, детекция ранних показателей нарушения фертильности позволяет предпринять своевременные меры по предупреждению развития осложнений [1]. Авторы предположили, что в случаях, когда воспаление не имеет клинической манифестации и микробиологического подтверждения, можно обнаружить изменения в состоянии медиаторов патологического процесса.

**Цель:** оценить возможность использования уровней ИЛ-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$  в отделяемом урогенитального тракта для прогнозирования бесплодия.

**Материалы и методы.** Исследования проведены у 30 фертильных пациентов (15 мужчин и 15 женщин) и у 93 пациентов, перенесших урогенитальную инфекцию (контроль излеченности) или имеющих латентную урогенитальную инфекцию (46 мужчин и 47 женщин), проходивших обследование в областном кожно-венерологическом диспансере и областном перинатальном центре. В исследование включены женщины с ненарушенным 28-30 дневным менструальным циклом, цервикальное отделяемое забирали для исследования в первую фазу менструального цикла, на 10 день, чтобы избежать контаминации компонентами крови или тканей эндометрия. Забор материала во второй фазе менструального цикла не проводился, так как во второй фазе менструального цикла наблюдается закономерное повышение концентрации ИЛ-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$  и фактора некроза опухоли альфа (TNF  $\alpha$ ), связанное с физиологическим прорывом фолликула и не отражающего патологического процесса [2]. Исследование эякулята и цервикального отделяемого включало определение ИЛ-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$  иммуноферментным методом с использованием наборов «Вектор Бест». Результаты обрабатывались методами вариационной статистики с использованием пакета программ для ПК «Microsoft Excel».

**Результаты и обсуждение.** У пациентов с урогенитальным воспалением в эякуляте и цервикальном отделяемом было зарегистрировано одновременное повышение уровней

ИЛ-1 $\beta$  до  $38,8 \pm 3,8$  пг/мл (против  $27,8 \pm 3,1$  пг/мл у здоровых) и IFN- $\gamma$  – до  $8,1 \pm 0,5$  пг/мл (против  $5,2 \pm 0,7$  пг/мл). На момент обследования пациентов не беспокоило отсутствие зачатия, но имелись жалобы на дискомфорт в половых органах, сухость слизистых оболочек, слабые непостоянные боли в паховой области и промежности. В последующем у 37 мужчин и 34 женщин развилось вторичное, инфекционно обусловленное бесплодие.

Полученные данные регистрировались в ранние сроки обследования, что позволило предположить возможность их использования в качестве информативных показателей развития репродуктивных нарушений. Был разработан способ прогнозирования формирования инфертильности (получен патент РФ), который осуществляется следующим образом. Проводятся забор исследуемого материала (эякулята у мужчин, отделяемого цервикального канала у женщин) при подозрении на латентное урогенитальное воспаление. Пробы центрифугируют при 6000 об/мин в течение 15 мин, отбирают супернатант и проводят необходимые разведения образцов с использованием растворов из комплектов наборов для проведения иммуноферментного анализа (ИФА-набор), с получением рабочего разведения анализируемого образца. В соответствующие лунки планшетов с иммобилизованным на внутренней стороне поверхности моноклональными антителами к ИЛ-1 $\beta$  или IFN- $\gamma$  вносят в дубликатах по 100 мкл каждой калибровочной пробы (стандартные, прилагаются к ИФА-набору, используются для построения калибровочного графика), по 100 мкл контрольного образца и по 100 мкл анализируемых образцов в рабочем разведении. Планшеты инкубируют в течение 30 мин при температуре  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ . По окончании инкубации содержимое лунок удаляют и промывают рабочим промывочным раствором из ИФА-набора, после чего в каждую лунку вносят по 100 мкл

рабочего раствора конъюгата из того же набора, и инкубируют в течение 30 мин при температуре  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ . Затем содержимое лунок удаляют и промывают рабочим промывочным раствором из ИФА-набора. Во все лунки вносят по 100 мкл рабочего раствора тетраметилбензидина и инкубируют в темноте в течение 10-15 мин при температуре  $18-25^\circ\text{C}$ . Во все лунки вносят по 100 мкл стоп-реагента, при этом содержимое лунок окрашивается в желтый цвет. Затем проводят измерение величины оптической плотности растворов на фотометре вертикального сканирования на длине волны 450 нм. В соответствии с калибровочной зависимостью определяют массовую концентрацию интерлейкина 1 бета в пг/мл и массовую концентрацию интерферона гамма в пг/мл. При содержании ИЛ-1 $\beta$  >  $38,8 \pm 3,8$  пг/мл и одновременном содержании IFN- $\gamma$  >  $8,1 \pm 0,5$  пг/мл прогнозируют формирование репродуктивных нарушений.

**Заключение.** Таким образом, у пациентов, перенесших урогенитальную инфекцию или имеющих латентную урогенитальную инфекцию с формирующимся вторичным микробно обусловленным бесплодием, но не имеющих первичного, эндокринного, аутоиммунного или травматического бесплодия, в секретах урогенитального тракта повышается уровень ИЛ-1 $\beta$  и одновременно повышается уровень IFN- $\gamma$  по сравнению со здоровыми фертильными обследуемыми. Обнаруженные изменения можно использовать для раннего выявления формирующегося вторичного бесплодия.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Глазкова Л. К., Гирш В. А. III Всероссийский конгресс дерматовенерологов. Тезисы научных работ, 27–30 октября 2009, 77.
2. Семенов А. В., Сотникова Н. Ю. Медицинская иммунология 2007, 1, 91-96.
3. Штиль О. О. Дисс. ... канд. мед. наук. Оренбург 2010, 152.

#### IMMUNOLOGICAL CRITERIA FOR FORECASTING THE SECONDARY STERILITY

Zherebyateva O. O., Setko N. P., Mikhaylova E. A., Kirgizova S. B.,  
Konstantinova O. D., Kshnyaseva S. K., Mahalova G. O., Lyashenko I. E.

*Orenburg State Medical University, Orenburg, Russia*

The interleukin level in discharges from the urogenital tract of patients with a latent inflammation is defined. Reliable augmentation in the level of IL-1 $\beta$  and IFN- $\gamma$  was revealed that is offered to use for forecasting the development of sterility.

*Key words:* sterility, cytokines, forecasting.

## ФИЗИЧЕСКОЕ И ПОЛОВОЕ РАЗВИТИЕ, А ТАКЖЕ ЦИТОКИНОВЫЙ СТАТУС У ДЕВОЧЕК-ПОДРОСТКОВ, ПРОЖИВАЮЩИХ В ХЛОПКОСЕЮЩИХ РЕГИОНАХ КАЗАХСТАНА

Жумадилова А.<sup>1</sup>, Ешимбетова Г.З.<sup>2</sup>, Бапаева Г.Б.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Международный Казахско-Турецкий университет им. Х.А. Ясави, Туркестан, Казахстан;

<sup>2</sup>Ташкентский институт усовершенствования врачей, Ташкент, Узбекистан;

<sup>3</sup>АО Национальный научный центр материнства и детства, Астана, Казахстан

Проведено обследование 524 девочек-подростков, из них 253 девочки проживали в зоне воздействия пестицидов и 271 девочка (контрольная группа) не являлись жительницами данного региона. Установлено, что повышение уровня хлорорганических пестицидов приводит к повышению продукции ИЛ-1 $\alpha$  и ИЛ-1 $\beta$  и снижению ИФР-1, что клинически проявляется в отставании физического и полового развития. Эти факторы могут служить маркером снижения репродуктивной функции.

*Ключевые слова:* девочки-подростки, пестициды, физическое и половое развитие, цитокины.

Влияние вредных факторов окружающей среды в период развития репродуктивных органов может иметь самые разрушительные последствия, как в ближайшие, так и в зрелые периоды жизни женщины.

Хлопководство является важнейшей отраслью сельского хозяйства южных регионов Республики Казахстан (РК), которая в последние десятилетия испытывает новый подъем. Несмотря на многочисленные научные исследования, до сих пор остаются неизвестными истинные масштабы вредного влияния хлорорганических пестицидов на подрастающее поколение.

Учитывая вышеизложенное, целью данного исследования явилось изучение особенностей физического и полового развития, а также иммунного статуса у девочек-подростков, проживающих в хлопкосеющем регионе РК.

**Материалы и методы.** В исследование были включены 524 девочек-подростков в возрасте 10-17 лет. Все обследуемые девочки проживали в сельских регионах, т.е. были сопоставимы по социально-бытовым и климатогеографическим факторам. Основную группу составили 253 девочки, проживающие в хлопкосеющих регионах, где широко применялись хлорорганические пестициды (ДДТ и эндрин). 271 девочка-подросток, не проживающие в хлоп-

косеющих районах РК, составили группу контроля. Всем им проведена оценка физического и полового развития.

У 87 девочек (47 – основная и 40 – контрольная) из этой группы исследованы цитокины в сыворотке крови: ИЛ-1 $\alpha$ , ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-1РА и инсулиноподобный фактор роста-1 (ИФР-1) в периферической крови твердофазным иммуноферментным методом с использованием тест-систем «Вектор-Бест» (г. Новосибирск).

**Результаты и их обсуждение.** Наши исследования показали, что хлорорганические пестициды оказывают негативное влияние как на физическое, так и на половое развитие девочек. Так, отставание по показателям от сверстниц отмечалось в динамике увеличения массы тела в основном в возрасте от 10 до 13 лет ( $p < 0,01$ ) и с 15 до 18 лет ( $p < 0,05$ ).

Замедление роста тела при воздействии хлорорганических пестицидов отмечалось во всех возрастных группах основной группы. Быстрый рост длины тела, хотя в обеих исследуемых группах отмечался в возрасте от 11 до 12 лет, но в контрольной группе он достигал 9,9 см за год. В основной группе в среднем девочки росли до 6,9 см за 1 год, что было медленнее контроля ( $p < 0,01$ ).

У девочек-подростков, проживающих в хлопкосеющих регионах, обнаружено запоздалое

половое развитие. Так, если в контрольной группе отмечено начало менструальной функции с  $11,9 \pm 0,3$  лет, то в исследуемой группе эти показатели были равны в среднем  $13,8 \pm 0,5$  годам.

Исследование характера менструальной функции показал, что 80 девочек-подростков из 253 обследованных основной группы (31,6%), страдают дисменореей. У 51 девочки (20%) обнаружена олигоопсоменорея и у 42 девочек (16,6%) выявлена первичная аменорея.

Изучение уровня цитокинов в сыворотке крови показало достоверное увеличение провоспалительных цитокинов ИЛ-1 $\alpha$  и ИЛ-1 $\beta$  у девочек, проживающих в зоне воздействия пестицидов. В то же время, достоверных различий между содержанием ИЛ-1 РА между группами не обнаружено ( $p > 0,05$ ).

Уровень ИФР-1 в крови девочек, проживающих в зоне воздействия пестицидов был снижен ( $443,51 \pm 41,23$  пг/мл), по сравнению со сверстницами контрольной группы ( $778,05 \pm 30,02$  пг/мл) ( $p < 0,001$ ).

Анализ корреляционной зависимости между параметрами иммунного статуса и концентрацией хлорорганических пестицидов выявил

среднюю положительную корреляционную зависимость не только между уровнем ИЛ-1 $\alpha$  и ИЛ-1 РА, но и между уровнем ИЛ-1 $\alpha$  и содержанием ДДТ и эндрина в крови ( $r_1 = 0,393$  и  $r_2 = 0,324$  соответственно)

Таким образом, для девочек, проживающих в зоне воздействия пестицидов, характерно отставание в физическом и половом развитии. Повышение продукции ИЛ-1 $\alpha$  и ИЛ-1 $\beta$ , а также снижение ИФР-1, по всей видимости, являются последствием токсического влияния хлорорганических пестицидов на женский организм, что подтверждается показателями физического и полового развития девочек-подростков.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Buck Louis G. M., Gray L. E. Jr. et al. *Pediatrics* 2008 Feb;121 Suppl 3: S192-207.
2. Ferris J. S., Flom J. D., Tehranifar P. et al. *Pediatr Perinat Epidemiol.* 2010 Nov;24 (6):515-23
3. Кетлинский С. А. Цитокины / С. А. Кетлинский, А. С. Симбирцев. – СПб.: Фолиант, 2008. – 552 с.
4. Бапаева Г. Б., Кадырова Р. У. Материалы II Всероссийской конференции «Проблемы женского здоровья и пути их решения». – Москва. – 2008. – с. 7–8.

### PHYSICAL AND SEXUAL DEVELOPMENT AND CYTOKINE STATUS IN ADOLESCENT GIRLS LIVING IN THE COTTON GROWING REGIONS OF KAZAKHSTAN

Zhumadilova A.<sup>1</sup>, Eshimbetova G. Z.<sup>2</sup>, Bapaeva G. B.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>HA Yasavi International Kazakh-Turkish University, Turkestan, Kazakhstan; <sup>2</sup>Tashkent Extension Course Institute for Medical Practitioners, Tashkent, Uzbekistan; <sup>3</sup>JSC National Research Center of Motherhood and Childhood, Astana, Kazakhstan

There were surveyed 524 girls – teenagers, including 253 girls living in the affected area with pesticides and 271 girls (control group) were not the residents of the region. It was found that the increased levels of organochlorine pesticides led to the increased production of IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$  and reduced IGF-1, which was clinically manifested in the delay in physical and sexual development. These factors can serve as a marker of reproductive function decline.

*Keywords:* adolescent girls, pesticides, physical and sexual development, cytokines.

## МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА СТЕПЕНИ ПОВРЕЖДАЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ МЕМАНТИНА И РИВАСТИГМИНА НА ТИМУС КРЫС ПРИ МНОГОКРАТНОМ ВВЕДЕНИИ

Жучков С.А.<sup>1</sup>, Иванова Т.А.<sup>2</sup>, Королева И.В.<sup>2</sup>,  
Вихорев Ю.Б.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ФГБОУ ВПО «Орловский государственный университет», медицинский институт, Орел; <sup>2</sup>ФГБУН Институт физиологически активных веществ РАН, Черноголовка, Россия

С помощью гистологических методов изучено повреждающее действие мемантина и ривастигмина на тимус крыс при многократном введении. Морфологических проявлений токсического воздействия изучаемых препаратов в отношении лимфоидной ткани тимуса при многократном введении зафиксировано не было. В то же время выявлено умеренное токсическое действие на внутренние органы крыс в дозах 40 мг/кг для мемантина и 1,6 мг/кг для ривастигмина. Дозы 1 мг/кг и 0,16 мг/кг соответственно, являются дозами не вызывающими побочных эффектов

*Ключевые слова:* тимус, субхроническая токсичность, глутаматные рецепторы.

Глутамат представляет собой основной возбуждающий нейромедиатор, который отвечает за передачу 75% возбуждающих сигналов в головном мозге. Существует два основных типа рецепторов, посредством которых осуществляется реализация его биологического действия: метаботропные (сопряженные с G-белками), а также ионотропные рецепторы, которые представляют собой активируемые лигандами ионные каналы, состоящие из нескольких субъединиц (каинатные рецепторы, AMPA-рецепторы и NMDA-рецепторы). В то же время глутамат является веществом, играющим важную роль в регуляции иммунного ответа, как путем  $Ca^{2+}$ -опосредованных механизмов при взаимодействии с ионотропными рецепторами, которые экспрессируются иммунокомпетентными клетками [1, 2], так и метаботропными, через активацию G-белков, в том числе тирозинкиназы C и, возможно, тирозиновых янус-киназ. Также показано, что глутамат играет важную роль в развитии T-клеток [3].

В клинической практике существует достаточно широкий спектр лекарственных препаратов, влияющих на ионотропные рецепторы и применяющихся для лечения заболеваний нервной системы. Однако их влияние

на иммунную систему представляется недостаточно изученным. В наших предыдущих работах были изучены иммунотоксические эффекты бинарного аллостерического лиганда AMPA-рецепторов [4]. Учитывая вышесказанное, представляется актуальным оценить влияние на иммунную систему лекарственных препаратов, применяющихся при лечении заболеваний ЦНС, сопровождающихся когнитивной дисфункцией и влияющих на NMDA-рецепторы (Мемантин), а также на синтез белков-переносчиков глутамата (Ривастигмин) [5].

В связи с этим, целью настоящего исследования являлась морфологическая оценка степени повреждающего действия мемантина и ривастигмина на тимус крыс при многократном введении.

**Использованные методы.** Исследования проводились на SPF-крысах стока Вистар, со средней массой 150–200 г., полученных из лицензированного источника, имеющего действующую AAALAC аккредитацию – НПП «Питомник лабораторных животных» ФИБХ РАН (МО, г. Пущино). Содержание крыс и все манипуляции с ними проводились в условиях вивария ИФАВ РАН в соответствии с ГОСТ Р 53434-2009 «Принципы надлежащей лабора-

торной практики» и утвержденными Стандартными операционными процедурами. Животных размещали в вентилируемых микроизоляторах типа One Cage (Lab. Products inc., США) на подстиле LIGNOCEL BK 8-15 (JRS, Германия). Все параметры содержания животных были стандартизированы и соответствовали нормативным документам. Для кормления животных использовали стерилизованный стандартный гранулированный корм «Чара» (SPF-содержание), производитель – ООО «Мультиторг», автоклавированный при 121 °С. В качестве питья крысы получали автоклавированную очищенную воду. Корм и воду животным давали без ограничения.

Мемантин в виде водной суспензии вводили внутривентрикулярно, ежедневно, однократно в течение 30 дней с помощью специального зонда для крыс, в первой половине дня в 2-х дозах: 1 и 40 мг/кг. Контрольные животные получали дисперсионную среду в том же объеме. Наивысшая доза в 40 раз превышала суточную максимальную терапевтическую дозу для человека, низшая доза соответствовала максимальной суточной терапевтической дозе для человека 1 мг/кг.

Ривастигмин в виде трансдермальной терапевтической системы наносили на кожу в двух дозах: 0,16 мг/кг и 1,6 мг/кг в течение 22 дней. Наивысшая доза, 8-микратно превышала терапевтическую дозу для человека. Низшая доза 0,16 мг/кг чуть ниже максимальной рекомендованной для человека (0.2 mg/kg for a 60 kg patient) и незначительно превышала недействующую дозу для грызунов (NOAEL in rodents and dogs was around 0.11 mg/kg). Контролем служили животные, получавшие аппликации плацебо.

Каждая группа состояла из 12 особей (6 самок и 6 самцов). Предусмотрено было включение в группы дополнительно 12 животных для наблюдения за обратимостью, сохранением или же отсроченным проявлением токсических эффектов в течение 14 дней после окончания периода введения.

По окончании эксперимента крысы были подвергнуты СО<sub>2</sub>-эвтаназии с последующим обескровливанием путем тотального забора крови из нижней полой вены. Внутренние органы, полученные после вскрытия, взвешивали и рассчитывали процентное отношение массы органа к массе тела, определенной непосредственно перед некропсией. Биоматери-

ал для гистологических и морфометрических исследований фиксировали в 10% нейтральном формалине (pH 7.4). Проводку, заливку, резку и окраску образцов осуществляли по стандартным методикам с некоторыми изменениями. Для изготовления гистологических препаратов использовали автоматический тканевой процессор Leica ASP 200S, систему для заливки тканей Leica EG1160, моторизованный ротационный микротом Leica RM 2265, а также аппарат для многоцветного окрашивания Leica ST5020 Multistainer (фирма Leica, Германия).

Морфологический анализ препаратов и морфометрические измерения проводили с использованием световых микроскопов Leica CME (Leica, Германия), и Micros MC100 (XP 5MP) (Micros, Австрия)

**Основные результаты.** При обзорной микроскопии гистологических срезов тимуса патологических изменений, вызванных введением исследуемых веществ, не обнаружено. Тимус имеет типичное дольчатое строение, покрыт тонкой соединительнотканной капсулой от которой вглубь органа отходят перегородки. В центре органа располагаются крупные дольки с хорошо различимым корковым и мозговым веществом, а по периферии – дольки меньшего размера, между которыми определяется небольшое количество жировой ткани. Паренхима органа имеет типичное строение, граница коркового и мозгового вещества четкая у животных обоего пола во всех группах. У самцов представительство коркового и мозгового вещества в дольках тимуса контрольных и экспериментальных групп визуально не отличается. У самок, получавших изучаемые препараты, наблюдается некоторая вариабельность этого показателя, однако, в целом, строение органа не отличается от такового у контрольных животных. В паренхиме тимуса у животных всех групп имеются единичные дистрофически измененные ретикулоэпителиальные клетки, отмечается полнокровие сосудов. Частота встречаемости выявленных отклонений от нормы одинакова во всех группах животных.

В то же время морфологический анализ гистоструктуры остальных внутренних органов крыс продемонстрировал наличие признаков токсичности Мемантина в дозе 40 мг/кг в отношении головного мозга, почек и печени, а введение Ривастигмина в дозе 1,6 мг/кг

привело к появлению отклонений от нормы в строении почек, печени и надпочечников. Степень выраженности повреждений варьировала от слабой до умеренной. Выявленные изменения были обратимыми и редуцировались через 14 суток после отмены препаратов.

**Заключение.** Полученные результаты могут свидетельствовать о наличии умеренной токсичности у изучаемых препаратов в дозах 40 мг/кг и 1,6 мг/кг соответственно, в то время как применение минимальных не приводило к возникновению патологических отклонений, что позволяет их считать дозами не вызывающими побочных эффектов (NOAEL – no-observed-adverse effects at the lowest dose level). Следует отметить, что не было зафиксировано морфологических проявлений токсического воздействия изучаемых препаратов в отношении тимуса при многократном ведении. Это

факт требует дальнейшего изучения с применением иммуногистохимических методов исследований, позволяющих детально оценить влияние лекарственных препаратов этих групп на пролиферацию, дифференцировку и апоптоз тимоцитов в условиях длительного воздействия.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Boldyrev A. A., Bulygina E. R., Davydova O. N. et al. *Neurosci. Res.* 2006, 55 (1), 67.
2. Болдырев А. А., Брюшкова Е. А., Владыченская Е. А. *Биохимия* 2012, 77 (2), 160-168.
3. Affaticati P., Mignen O., Jambou F. et al. *Cell Death and Differentiation* 2011, 18 (1), 99-108
4. Жучков С. А., Кинзирский А. С., Бачурин С. О., Снимщкова И. А. *Российский иммунологический журнал.*, 2014, 8 (17), № 3, 676-679
5. Andin J., Enz A., Gentsch C., Marcusson J., Dement *Geriatr Cogn Disord.* 2005, 19 (1):18-23

### MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS OF TOXIC DAMAGE OF RAT'S THYMUS UNDER CONDITION OF PROLONGED EXPOSURE OF PHARMACOLOGICAL SUBSTANCES MEMANTIN AND RIVASTIGMINE

Zhuchkov S. A.<sup>1</sup>, Ivanova T. A.<sup>2</sup>, Koroleva I. V.<sup>2</sup>  
Vichorev Yu. B.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>FSBES HPE «Orel state university», medical institute, Orel; <sup>2</sup>FSBSS Institute of physiologically active compounds RAS, Chernogolovka, Russia

The toxicological effects of repeated doses of memantine and rivastigmine on the thymus of rats were study with histological methods. We are demonstrated that repeated doses of memantine and rivastigmine did not show any toxicity effects against thymic lymphoid tissue. However moderate toxicity effects on structure internal organs were detected in doses 40 mg/kg for memantine and 1,6 mg/kg for rivastigmine. A dose of 1 mg/kg and 0.16 mg/kg respectively, are no-observed-adverse effects at the lowest dose level (NOAEL)

*Keywords:* thymus, subchronic toxicity, glutamate receptors.



## ВЛИЯНИЕ ТРОФОБЛАСТИЧЕСКОГО $\beta$ 1-ГЛИКОПРОТЕИНА НА ЭКСПРЕССИЮ CTLA-4 И GITR Т-РЕГУЛЯТОРНЫМИ ЛИМФОЦИТАМИ. РОЛЬ МОЛЕКУЛ CD9

Заморина С. А.<sup>1,2</sup>, Раев М. Б.<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>ФГБУН Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь; <sup>2</sup>ФГБОУ ВПО Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь; <sup>3</sup>ФГАОУ ВПО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б. Н. Ельцина», Екатеринбург, Россия

Изучали влияние трофобластического  $\beta$ 1-гликопротеина (ТБГ) на экспрессию активационных маркеров CTLA-4 и GITR на поверхности Т-регуляторных лимфоцитов (Treg), с оценкой роли молекул CD9 в реализации эффектов. Установлено, что ТБГ (10, 100 мкг/мл) увеличивал количество Treg (CD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>), одновременно стимулируя экспрессию на этих клетках CTLA-4 и GITR. Показано, что эффекты, оказываемые ТБГ (100 мкг/мл) на дифференцировку Treg, отменялись в условиях блокады CD9 антителами – в частности, экспрессия FOXP3, CTLA-4, GITR. Таким образом, ТБГ способствует дифференцировке CD4<sup>+</sup>-клеток в Treg и экспрессии ими активационных маркеров CTLA-4 и GITR, реализуя свои эффекты с вовлечением молекул CD9.

**Ключевые слова:** трофобластический  $\beta$ 1-гликопротеин (ТБГ), Т-регуляторные лимфоциты (Treg), CD9.

Т-регуляторные лимфоциты (Treg) в настоящее время считаются «истинными супрессорами», угнетающими иммунные реакции, как путем контактного взаимодействия с эффекторными клетками, так и через активацию индоламин-2,3-диоксигеназы (IDO). В итоге эти события вызывают анергию и апоптоз Т-эффекторных клеток и формируют специфическую толерантность к полуаллогенному эмбриону. Транскрипционный фактор FOXP3 относится к семейству FOX (Forkhead box) и обеспечивает дифференцировку и функционирование Treg. В то же время, функциональная активность Treg ассоциирована с поверхностной экспрессией CTLA-4 (цитотоксический антиген Т-лимфоцитов 4) и GITR (глюкокортикоид-индуцируемый TNF-рецептор). Во время беременности происходит увеличение пула Treg периферической крови, однако патологические состояния сопровождаются снижением уровня этих клеток. Известно, что трофобластический  $\beta$ 1-гликопротеин (ТБГ), воздействуя на дендритные клетки, повышает активность Treg [1]. Кроме этого, показано, что ТБГ увеличивает количество адаптивных Treg в культуре монону-

клеаров на модели клеток человека [2]. Рецепторный аппарат ТБГ человека находится в стадии изучения, однако предполагается, что ТБГ реализует свои эффекты на клетки иммунной системы через молекулу CD9, которая относится к надсемейству тетраспонинов и присутствует как на лимфоцитах, так и на моноцитах [3]. В целом, ТБГ обладает иммунорегуляторной активностью, и является одним из наиболее информативных маркеров формирования и функционирования фетоплацентарной системы.

**Цель исследования:** изучение влияния ТБГ на экспрессию CTLA-4 и GITR на поверхности Treg в системе *in vitro* на модели клеток человека, оценка роли молекул CD9.

**Материал и методы.** ТБГ человека получали авторским запатентованным методом [4]. В экспериментах использовали физиологические концентрации ТБГ, соответствующие его уровню в периферической крови матери в динамике беременности: 1, 10 и 100 мкг/мл. Исследовали периферическую кровь небеременных женщин репродуктивного возраста (n=6). Методом позитивной иммуномагнитной сепарации («InVitrogen», США) из суспензии

моноклеаров получали CD4<sup>+</sup>-лимфоциты, которые инкубировали с ТБГ в плоскодонном 96-луночном планшете в ППС в течение 72 ч при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. Для изучения роли молекул CD9 применяли немеченые антитела (anti-CD9; «BioLegend», США; 0,5мг/мл), которые вносили в культуру до ТБГ (5 мин., 37°C), ряд проб содержал изотипический контроль антител. Блокировали только высокую концентрацию ТБГ (100 мкг/мл), поскольку ранее мы продемонстрировали ее эффективность в отношении Treg [2]. Для индукции CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов в фенотип Treg в культуры добавляли IL-2 (10 нг/мл, «Sigma», США), ФГА (2,5 мкг/мл, «Sigma», США), и нейтрализующие анти-IFN-g и анти-IL-4 антитела (10 мкг/мл, «eBioscience», США). После культивирования оценивали количество Treg как процент CD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> клеток (anti-human FoxP3-Per-Cy5; anti-human CD4-FITC). Параллельно оценивали экспрессию CTLA-4 (anti-human CD152-PE) и GITR (anti-human CD357-Alexa Fluor 488) в гейте CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов (все антитела «eBioscience», США). Проверку статистических гипотез об отсутствии межгрупповых различий осуществляли с помощью непараметрического U-критерия Манна-Уитни (p<0,05).

**Результаты и обсуждение.** Показано, что 72 ч инкубация ТБГ в высоких концентрациях с CD4<sup>+</sup> Т-клетками приводит к достоверному повышению количества Treg (CD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> (%); контроль – 3,38±0,72; ТБГ 10 мкг/мл – 6,16±1,70; ТБГ 100 мкг/мл – 8,74±1,38). Одновременно, ТБГ в тех же концентрациях увеличивал уровень активных Treg, экспрессирующих GITR (CD4<sup>+</sup>GITR<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> (%); контроль – 0,91±0,33; ТБГ 10 мкг/мл – 2,13±0,58; ТБГ 100 мкг/мл – 2,40±0,99). Однако, только высокая (100 мкг/мл) концентрация ТБГ увеличивала экспрессию CTLA-4 (CD4<sup>+</sup>CTLA4<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> (%); контроль – 2,67±0,75; ТБГ 100 мкг/мл – 4,85±1,23). В то же время, низкая концентрация ТБГ (1 мкг/мл) не оказывала достоверных эффектов. На фоне блокады молекул CD9 антителами стимулирующий эффект ТБГ (100 мкг/мл) в отношении экспрессии FOXP3, CTLA-4 и GITR полностью отменялся, что свидетельствует о вовлечении этих рецепторов в реализацию сигнала. Относительно недавно показано, что активация CD9 вовлекает аденилатциклаз-

ную систему (аденилатциклаза (АЦ) /протеинкиназа А (ПКА) /цАМФ) в реализацию сигнала [5]. В контексте нашего исследования важен тот факт, что цАМФ-опосредованная передача сигнала в наивных Т-клетках может привести к индукции FOXP3. Так как экспрессию FOXP3 под воздействием ТБГ изучали на фоне индукции CD4<sup>+</sup>-клеток IL-2 и ФГА, то очевиден некий суммирующий эффект сигналов с разных рецепторов, приводящий в итоге к усилению экспрессии FOXP3.

Экстраполируя полученные данные на ситуацию *in vivo*, можно сказать, что во II–III триместрах, когда уровень ТБГ значительно повышается, этот белок эффективно повышает количество Treg и его функционал, ассоциированный с экспрессией мембранного маркера CTLA-4 и GITR. CTLA-4 накапливается в лизосомах и секретируется к месту контакта Т-лимфоцита с антигенпрезентирующей клеткой (АПК) после стимуляции TCR. Взаимодействие Treg с АПК через CTLA-4 приводит к экспрессии в последних фермента IDO и усилению катаболизма триптофана, что еще больше усиливает материнско-фетальную толерантность. Ранее нами показано, что ТБГ усиливает экспрессию IDO в периферических моноцитах [2], что формирует дополнительную стимуляцию Treg. Известно, что связывание GITR с лигандом на эффекторных клетках блокирует их пролиферацию, и ее присутствие характеризует функционально зрелые Treg с высокой супрессорной активностью. Таким образом, ТБГ индуцирует дифференцировку Т-лимфоцитов в Treg и активирует экспрессию этими клетками CTLA-4 и GITR, вовлекая молекулы CD9.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Martinez F.F., Knobel C.P., Sanchez M.C. et al. Eur. J. of Immunol. 2013. 42 (6). 1573-1584.
2. Заморина С.А., Раев М.Б. Физиология человека. 2015. 41 (1). 117-123.
3. Ha C.T., Waterhouse R., Wessells J., Wu J.A., Dveksler G.S. J. Leukoc. Biol. 2005. 77 (6). 948-957.
4. Раев М.Б. Способ выделения и очистки трофобластического β-1-гликопротеина. Патент РФ № 2367449, опубликован 20.09.2009, Бюл. № 26.
5. Muroi Y., Sakurai T., Hanashi A., Kubota K. et al. Reproduction. 2009. 138 (6). 945-951.

## TROPHOBLASTIC $\beta$ 1-GLYCOPROTEIN EFFECT ON CTLA-4 AND GITR T-REGULATORY LYMPHOCYTE EXPRESSION. THE ROLE OF MOLECULAR CD9

S. A. Zamorina<sup>1,2</sup>, M. B. Rayev<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>FSBSI Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms UB RAS, Perm; <sup>2</sup>FSBEI HPE Perm State National Research University, Perm; <sup>3</sup>FSAEI HPE "Ural Federal University named after the first President of Russia B. N. Yeltsin", Ekaterinburg, Russia

We studied the effect of trophoblastic  $\beta$ 1-glycoprotein (PSG) on the surface expression of CTLA-4 and GITR activation markers on T-regulatory lymphocytes (Treg), and evaluated the role of CD9 molecules in the realization of the effects. It was established that PSG (10, 100  $\mu$ g/ml) increased the number of Treg (CD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>), while also stimulating the CTLA-4 and GITR expression on these cells. It is shown that the effects rendered by PSG (100  $\mu$ g/ml) on the differentiation of Tregs were abolished under CD9 blockade by antibodies – in particular, the expression of FOXP3, CTLA-4, GITR. Thus, PSG promotes the differentiation of CD4<sup>+</sup> into Treg cells and their expression of CTLA-4 and GITR activation markers, while realizing the effects involving the CD9 molecules.

## ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ АЦЕГРАМ-СПРЕЯ (СИНТЕТИЧЕСКОГО ПЕПТИДА АКТИВНОГО ЦЕНТРА ГМ-КСФ) НА ХАРАКТЕР РЕГЕНЕРАТИВНО-ПЛАСТИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ ШЕЙКИ МАТКИ И МИКРОФЛОРУ ВЛАГАЛИЩА ПОСЛЕ ПРОЦЕДУРЫ-ИССЕЧЕНИЯ АНОМАЛЬНОЙ ТКАНИ ШЕЙКИ У ЖЕНЩИН С ЦЕРВИКАЛЬНОЙ ИНРАЭПИТЕЛИАЛЬНОЙ НЕОПЛАЗИЕЙ

Зуева Е. Б.<sup>1</sup>, Гольцова И. А.<sup>1</sup>, Зурочка А. В.<sup>1</sup>, Зурочка В. А.<sup>1</sup>,  
Мякишев К. И.<sup>2</sup>, Зайнетдинова Л. Ф.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ФБГУН института Иммунологии и физиологии УрО РАН, Екатеринбург; <sup>2</sup>ФБГУ ВПО Южно-Уральский медицинский университет МЗ РФ, Челябинск, Россия

Были изучены дозозависимые эффекты синтетического пептида активного центра ГМ-КСФ на течение репаративных процессов шейки матки после проведения петлевой электроэксцизионной процедуры – иссечения аномальной ткани шейки у женщин с цервикальной инраэпителиальной неоплазией (CIN1, CIN2). Исследования показали, что при широком диапазоне доз (от 10 мкг/мл до 80 мкг/мл) синтетический пептид оказывал выраженное репаративное действие на эпителий шейки матки после проведенной электроэксцизии. Применение препарата ускоряло процессы заживления примерно в 2-2,5 раза (к 10 суткам, в контроле 20-22 сутки), при этом было отмечено отсутствие таких осложнений, как кровотечение, стеноз цервикального канала и снижение количества отделяемого с раневой поверхности. При использовании пептида было отмечено отсутствие патогенной и условно-патогенной флоры влагалища в послеоперационном периоде на раневой поверхности.

**Ключевые слова:** синтетический пептид, ГМ-КСФ, электроэксцизия, шейка матки, репарация, микрофлора.

В числе наиболее актуальных заболеваний для населения г. Челябинска и Челябинской области остаются злокачественные новообразования, уровень которых постоянно растет. В Челябинской области каждый год злокачественные новообразования выявляют

примерно у 13 тысяч человек. За последние 40 лет показатель онкозаболеваемости населения вырос в 8,4 раза. В 2013 году показатели онкозаболеваемости на Южном Урале превысили 400 человек на 100 тысяч населения. Лидирующие строчки среди локализаций занимают рак предстательной железы, молочной железы, кожи, кишечника, женской половой сферы [1]. По данным Всемирной организации здравоохранения, больных раком станет больше на 70% в течение следующих 20 лет. Ежегодно на планете страшный диагноз «рак» получают более 12 миллионов человек, а больше 7,5 миллионов умирают от него. Рак шейки матки занимает первое место среди гинекологического рака и второе после рака молочных желез, как по частоте, так и по преждевременной гибели женщин в развитых странах в возрасте до 50 лет. По данным Международного агентства по изучению рака, ежегодно в мире регистрируется 371000 новых случаев рака шейки матки (РШМ), и 190000 женщин в год умирают от этого заболевания [2].

В России показатель заболеваемости РШМ в 2011 г. составил 13,70 на 100 тысяч женского населения. РШМ относится к наиболее распространенным онкологическим заболеваниям органов репродуктивной системы у женщин, и составляет около 12–20% злокачественных новообразований женских половых органов. В структуре заболеваемости органов репродуктивной системы у женщин, рак шейки матки занимает второе место, уступая лишь раку молочной железы. В последние годы отмечена тенденция к росту заболеваемости РШМ – за период 2001–2011 гг. прирост составил 26,94%, а среднегодовой темп прироста – 2,35%. В настоящее время отмечается неблагоприятная тенденция роста заболеваемости РШМ среди молодых женщин – в возрасте 15–24 лет в 4 раза, в возрасте 25–34 года – в 2,5 раза. Следовательно, заболеванию подвержена наиболее активная в репродуктивном и социальном отношении часть женского населения [2]. Сложность и многоплановость проблем в этой области определяет необходимость поиска оптимизации диагностики и лечения, а также профилактики этих заболеваний.

Реальной профилактикой РШМ является ранняя диагностика и своевременное лечение предраковых процессов шейки матки, к которым относят цервикальные интраэпителиальные неоплазии (CIN).

Этот термин является морфологическим и одновременно клиническим понятием, и включает в себя процесс пролиферации клеток с появлением в них атипии, особенно ядерной, с последующим изменением всей структуры эпителия, а также утратой нормального строения эпителиальных слоев.

В зависимости от интенсивности пролиферации клеток и выраженности структурной и клеточной атипии в слоях эпителия различают: легкую – (CIN 1), умеренную – (CIN 2) и тяжелую – (CIN 3) дисплазию.

Лечение дисплазии ШМ, должно быть комплексным, и включать в себя как хирургическое, так и лекарственное воздействие на организм. Лечебные мероприятия планируются индивидуально, и должны быть направлены на ликвидацию воспалительного процесса ШМ и влагиалища, удаление патологически измененной ткани, стимуляцию регенерации многослойного плоского эпителия и восстановление местного иммунного статуса.

Наиболее широко применяемой методикой ведения женщин с дисплазией ШМ является петлевая электроэксцизия. В ходе этой процедуры происходит иссечение аномальной ткани шейки матки электропетлей. Главным достоинством данной методики является возможность тотальной гистологической оценки всего удаленного фрагмента шейки матки, но у этого метода есть и недостатки.

Частым осложнением в послеоперационном периоде является кровотечение, вследствие отхождения струпа. Это возникает в 4,6% всех случаев. Стеноз цервикального канала или окклюзия наружного зева составляют от 1 до 5%, а также в большинстве случаев может возникнуть обострение хронических воспалительных процессов шейки матки.

Процедура эксцизии в зависимости от объема удаленной части шейки матки может оказывать влияние на репродуктивную функцию, что немаловажно при лечении женщин репродуктивного возраста.

Все это и послужило основанием для поиска других, более щадящих методов ведения пациентов в послеоперационном периоде.

Одним из таких подходов может быть применение новых препаратов, обладающих одновременно иммуностимулирующими, антибактериальными и репаративными свойствами, как недавно открытый синтетический пептид активного центра ГМ-КСФ [3,4,5].

**Материалы и методы.** В исследование были включены 126 женщин с дисплазией шейки матки 1,2 и 3 ст. в возрасте от 21 до 44 лет, которым было показано хирургическое лечение.

Хирургическое лечение проводилось с использованием высокочастотного радиохирургического прибора «Сургитрон» (производство USA). Для лечения всех пациенток был выбран метод петлевой эксцизии объемом в пределах здоровых тканей.

Перед проведением хирургического лечения – радиоволновой эксцизии ШМ – у всех пациенток провели: сбор гинекологического, аллергического и инфекционного анамнеза, а так же бактериоскопическое, онкоцитологическое, кольпоскопическое, молекулярно-биологическое (ПЦР на ВПЧ, хламидии, уреоплазму и микоплазму) исследование.

Для определения клинической эффективности местного применения р-ра пептида в послеоперационном периоде и для выявления и его оптимальной концентрации, пациентки были разделены на 5 групп с целью выявления дозозависимых эффектов Ацеграм-спрея:

1 – контрольная – без применения пептида – 10 чел, 2 – с применением 10 мкг/мл р-ра пептида – 8 чел, 3 – с применением 20 мкг/мл р-ра пептида – 9 чел, 4 – с применением 40 мкг/мл р-ра пептида – 11 чел, 5 – с применением 80 мкг/мл р-ра пептида – 9 чел.

После проведения радиоволновой эксцизии шейки матки по поводу CIN, пациентки использовали р-р пептида в виде вагинального спрея в течение 5 дней по 3 впрыскивания во влагалище 2 раза в день, что составило примерно 1 мл раствора активного вещества соответственно в каждой группе (концентрации указаны выше).

В послеоперационный период женщины находились под наблюдением 22 дня: осмотр проводили на 2-3 день, на 5-7 день, на 10-12 день и на 20-22 день.

Критериями эффективности лечения явились динамические изменения клинических симптомов: толщина струпа на послеоперационной ране, скорость его отторжения, площадь эпителизации, количественное и качественное состояние отделяемого из раны.

Во время осмотров у пациенток проводились: фотокольпоскопия, были взяты цитологические мазки с раневой поверхности и со стенки влагалища, а также было проведено гистологическое исследование

фрагмента шейки матки. После выявления оптимальной дозы препарата было проведено изучение влияния косметического средства Ацеграм-Спрея, где действующим веществом является синтетический пептид активного центра ГМ-КСФ в разведении 20 мкг/мл в послеоперационном периоде. У 15 женщин с CIN1 (60%) и у 10 с CIN2 (40%) были проведены исследования: обзорный мазок на 7 сутки и бактериологический посев на 30 сутки. Группа контроля состояла из 16 женщин с CIN1 (53,3%) и 14 женщин с диагнозом CIN2 (46,6%).

**Результаты и обсуждение.** Исследования показали, что в группах с использованием косметического средства Ацеграм-Спрея, где действующим веществом является синтетический пептид активного центра ГМ-КСФ, была отмечена положительная клиническая динамика, которая характеризовалась косметическим эффектом, отсутствием кровотечения после отторжения струпа и заживлением послеоперационной раны уже к 7-10 суткам; при этом было отмечено отсутствие воспалительного процесса, как в шейке матки, так и во влагалище.

Таким образом, местная терапия с использованием косметического средства Ацеграм-Спрея, где действующим веществом является синтетический пептид активного центра, позволила сократить сроки заживления в среднем на 15-20 дней, предотвратить развитие таких осложнений послеоперационного периода, как кровотечение вследствие отхождения струпа, обострение хронических воспалительных процессов шейки матки и образование стеноза шейки матки. Оптимальная доза препарата составила 20 мкг/мл по предложенной схеме лечения.

После местного применения (орошения) у женщин с CIN1 и CIN2 косметическим средством Ацеграм-Спрей, в разведении 20 мкг/мл в послеоперационном периоде при микроскопии было отмечено изменение следующих показателей: снижение количества слущенного эпителия, снижение эритроцитов и уменьшение количества слизи. Все это отмечалось при значительном снижении количества лейкоцитов, и это свидетельствует о выраженном антимикробном действии синтетического пептидного активного центра ГМ-КСФ на процессы воспаления и регенерации шейки матки в послеоперационном периоде.

Проведенное бактериологическое исследование у женщин после применения косметического средства Ацеграм-Спрея, (действующее вещество синтетический пептид активного центра ГМ-КСФ в разведении 20 мкг/мл) показало, что на 30 сутки после операционного воздействия и лечения препаратом отмечаются значительные изменения вагинальной микрофлоры у женщин с CIN1 и CIN2. После лечения пептидом у женщин практически до нормы восстанавливалась нормальная микрофлора (лактобактерии, бифидобактерии, бактероиды) и значительно уменьшалась обсемененность условно-патогенной микрофлорой, в первую очередь, кокковой флоры, гарднерелл, микоплазм и клостридий по сравнению с группой, находящейся на традиционном лечении. Возможно, такая нормализация микрофлоры связана, с одной стороны, с антибактериальными эффектами пептида, а с другой, – усилением функциональной активности гранулоцитов, обладающих высоким антибактериальным потенциалом и, в первую очередь, в отношении кокковой и условно-патогенной грамотрицательной флоры. Такое комбинированное воздействие способствует более быстрому очищению эпитепа от патогенной и условно-патогенной флоры, которая увеличивается в постоперационном периоде у женщин после электроэксцизии шейки матки, находящихся на традиционной терапии.

Таким образом, сочетание ранее используемых методов и новых подходов в ведении постоперационного периода дает возможность снизить бактериальные осложнения, так часто встречающиеся при проведении петлевой электроэксцизии. При новом подходе ведения пациентов отсутствует формирование рубцовой ткани, был получен более короткий период репаративных процессов (7-10 дней), сохранена анатомическая целостность шейки матки, гормональная и репродуктивная функции у женщин молодого возраста. Все это определяет целесообразность использования синтетического пептида активного центра ГМ-КСФ (АЦЕГРАМ – спрея) в практическом здравоохранении при лечении больных CIN1, CIN2.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Государственный доклад «О санитарно-эпидемиологической обстановке в Челябинской области в 2014 году». – Челябинск, 2014. – 286 с.
2. Jemal A., Bray F., Center M. M. et al. // *CA Cancer J Clin.* – 2011. – Vol. 61 (2). – P. 69-90.
3. Зурочка А. В., Суховой Ю. Г., Зурочка В. А. и др. Патент. № 2465001 от 27.10.2012.
4. Зурочка А. В., Зурочка В. А., Костоломова Е. Г. и др. // *Цитокины и воспаление.* 2012. Т. 11. № 2. С. 96-99
5. Зурочка В. А., Зурочка А. В., Костоломова Е. Г. и др. *Цитокины и воспаление.* 2012. Т. 11. № 4. С. 21-25.

### EFFECT OF ACEGRAM-SPRAY (SYNTHETIC PEPTIDE OF THE GM-CSF ACTIVE CENTER) ON REGENERATIVE AND PLASTIC PROCESSES OF UTERINE CERVIX AND VAGINAL MICROFLORA AFTER ABNORMAL CERVICAL TISSUE EXCISION IN WOMEN WITH A CERVICAL DYSPLASIA

Zuyeva E. B.<sup>1</sup>, Goltsova I. A.<sup>1</sup>, Zurochka A. V.<sup>1</sup>, Zurochka V. A.<sup>1</sup>,  
Myakishev K. I.<sup>2</sup>, Zaynetdinova L. F.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Federal Budgetary Public Institution of Science Institute of Immunology and Physiology of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg; <sup>2</sup>Federal Public Budgetary Educational Institution of Higher Education "Southern Ural State University" (National Research University), Chelyabinsk, Russia

The dose-dependent effects of the synthetic peptide of the GM-CSF active center on the course of repair and plastic processes of a uterine cervix after loop electroexcision procedure – resection of abnormal cervical tissue in women with a cervical intraepithelial neoplasia (CIN1, CIN2) were analyzed. It was demonstrated that within a wide range of doses (from 10 mkg/ml to 80 mkg/ml) this synthetic peptide had the expressed repair effect on the uterine cervical epithelium after an electroexcision, accelerating the healing processes approximately twice (by 10 days, in control 20-22 days), and as a consequence, the lack of such complications as wound-induced bleeding and marked secretion from a wound surface was observed. When using this peptide the lack of pathogenic and opportunistic vaginal flora on a wound surface was noted in the postoperative period.

*Key word:* synthetic peptide, GM-CSF, electroexcision, uterus cervix, repair, microflora.

## ОСОБЕННОСТИ СОДЕРЖАНИЯ НАИВНЫХ КЛЕТОК И Т-КЛЕТОК ПАМЯТИ В ПОПУЛЯЦИЯХ Т-ХЕЛПЕРОВ И ЦИТОТОКСИЧЕСКИХ Т-ЛИМФОЦИТОВ ПРИ РЕЦИДИВЕ УГРОЖАЮЩЕГО ПРИВЫЧНОГО ВЫКИДЫША

Иваненкова Н. И., Борзова Н. Ю., Сотникова Н. Ю.,  
Мишарина Л. В.

ФГБУ «ИвНИИ МцД им. В. Н. Горюкова» Минзгравы России, Иваново, Россия

Проведена оценка содержания наивных клеток и Т-клеток памяти в популяциях CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> лимфоцитов в подгруппах женщин с рецидивом и без рецидива угрожающего привычного выкидыша во втором триместре беременности. Установлено достоверное повышение Tem в популяции ЦТЛ в подгруппе пациенток с повторной угрозой прерывания по сравнению с аналогичным показателем в подгруппе без рецидива угрожающего выкидыша, что позволило разработать способ прогнозирования рецидива угрожающего выкидыша во втором триместре у женщин с привычным невынашиванием.

*Ключевые слова:* привычный выкидыш, Т-клетки памяти.

Привычный выкидыш является многофакторной патологией, что объясняет сложность в поиске причин и методов лечения, направленных на сохранение беременности. В 50% случаев этиология остается не установленной, в основе ее, по всей видимости, лежат нарушения в иммунной системе [1].

**Цель исследования** – оценить содержание наивных клеток и Т-клеток памяти на системном уровне в популяциях цитотоксических Т-лимфоцитов и Т-хелперов при угрожающем привычном выкидыше.

**Материалы и методы.** Клинически было обследовано 116 женщин в сроке гестации до 10 недель. Контрольную группу составили 34 женщины с неосложненной угрозой прерывания беременности, основную группу – 82 женщины с угрожающим привычным выкидышем. В зависимости от проводимой терапии основная группа пациенток была подразделена на 2 подгруппы: I подгруппа (n=42) получала только базовую сохраняющую терапию; II подгруппа (n=40) – базовую сохраняющую терапию в комплексе с транскраниальной электростимуляцией (ТЭС-терапией). Для проведения ТЭС-терапии использовали аппарат «Трансаир-05» (регистрационное удостоверение № ФСР 2010/07062). Сеансы проводились в течение 8-10 дней, продолжительностью 30 минут. У всех пациенток основной

группы перед данной беременностью отмечалось наличие подряд двух и более самопроизвольных прерываний беременностей до 12 недель. Иммунологически было обследовано 38 пациенток основной группы, которые независимо от вида проведенной сохраняющей терапии были подразделены на 2 подгруппы: 1 подгруппа (n=24) – без рецидива угрожающего выкидыша во втором триместре беременности; 2 подгруппа (n=24) – с рецидивом угрожающего выкидыша.

Методом трехцветной проточной цитофлюорометрии в периферической венозной крови определяли содержание наивных клеток – Tn (CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>), центральных клеток памяти – Tcm (CD45RA<sup>-</sup>CD62L<sup>+</sup>), претерминально-дифференцированных – Tem (CD45RA<sup>-</sup>CD62L<sup>-</sup>) и терминально-дифференцированных – Temra (CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>) клеток памяти в популяциях цитотоксических Т-лимфоцитов (CD8<sup>+</sup>, ЦТЛ) и Т-хелперов (CD4<sup>+</sup>, Th) на проточном цитофлюориметре FACSCantoII в программе FACSDiva (Becton Dickinson, США).

**Результаты.** По частоте выявления клинических признаков угрозы прерывания беременности достоверных различий между подгруппами основной группы выявлено не было. Тяжущие боли внизу живота и/или боли в пояснично-крестцовой области наблюдались у 90,5% пациенток I подгруппы

и 90,0% пациенток II подгруппы. Кровянистые выделения из половых путей наблюдались у 31,0% беременных I подгруппы и 35,0% беременных II подгруппы. Сочетание вышеописанных симптомов наблюдалось у 21,4% женщин I подгруппы и 25,0% женщин II подгруппы. На фоне применения комплексного лечения в сочетании с ТЭС-терапией тянущие боли внизу живота и/или боли в пояснично-крестцовой области купировались в среднем через 2-3 ( $2,33 \pm 0,08$ ) дня, кровянистые выделения из половых путей – через 2 ( $2,0 \pm 0,11$ ) дня. Однако в подгруппе с традиционным лечением аналогичные симптомы угрозы прерывания исчезли в более поздние сроки (тянущие боли – через  $4,63 \pm 0,12$  дня, кровянистые выделения – через  $3,88 \pm 0,12$  дня,  $p < 0,001$  в обоих случаях).

Повторно угроза прерывания беременности (во втором триместре) достоверно чаще встречалась у пациенток I и II подгрупп по сравнению с показателями группы контроля (57,5%, 33,3%, 0,0% соответственно,  $p < 0,01$  в обоих случаях), и у пациенток I подгруппы по сравнению с беременными II подгруппы ( $p < 0,05$ ). Угроза преждевременных родов достоверно чаще по сравнению с контрольной группой встречалась у женщин исследуемых подгрупп основной группы (I подгруппа – 29,4%, II подгруппа – 28,6%, контрольная группа – 0,0%,  $p < 0,05$  в обоих случаях), без достоверных различий между подгруппами.

Признаки плацентарной недостаточности (изменение структуры плаценты, ее утолщение или истончение, многоводие или маловодие, задержка роста плода при ультразвуковой фетометрии, нарушение гемодинамики по данным ультразвуковой доплерометрии) достоверно чаще диагностировались у беременных с традиционной сохраняющей терапией (41,2%) по сравнению с контрольной группой (23,5%,  $p < 0,05$ ) и пациентками, получавшими комплексное лечение с ТЭС-терапией (28,6%,  $p < 0,05$ ).

При анализе содержания Tn, Tcm, Tem, Temg в популяции периферических Tnu женщин основной группы без рецидива и с рецидивом угрожающего выкидыша во втором триместре статистически значимых отличий выявлено не было ( $p > 0,05$  во всех случаях). При оценке уровня наивных клеток, центральных, претерминально- и терминально-дифференцированных клеток памяти в попу-

ляции ЦТЛ в подгруппе женщин с рецидивом угрожающего выкидыша во втором триместре, нами выявлено достоверное повышение содержания Tem клеток в популяции CD8<sup>+</sup> лимфоцитов по сравнению с показателями женщин без рецидива угрожающего выкидыша ( $p < 0,001$ ). Достоверных различий в содержании Tn, Tcm, Temg в популяции ЦТЛ между подгруппами выявлено не было. На основании полученных данных был разработан способ прогнозирования рецидива угрожающего выкидыша путем определения относительного процентного содержания CD45RA<sup>-</sup>CD62L<sup>-</sup> в популяции CD8<sup>+</sup> лимфоцитов после проведенного лечения угрозы прерывания беременности, и при его значении более 23,9% прогнозируют возникновение угрожающего выкидыша во втором триместре у женщин с привычным невынашиванием в анамнезе (приоритетная справка № 2015102235 от 26.01.2015). Точность способа – 89,2%, чувствительность – 92,3%, специфичность – 88,3%.

Таким образом, использование ТЭС-терапии в комплексном лечении привычного невынашивания беременности приводит к более быстрому купированию симптомов угрозы прерывания, к уменьшению развития осложнений беременности (снижению частоты невынашивания беременности, плацентарной недостаточности).

Развитие повторной угрозы прерывания во втором триместре беременности независимо от терапии характеризуется изменением дифференцировки Т-клеток памяти, в частности увеличением содержания претерминально-дифференцированных эффекторных клеток памяти в популяции цитотоксических Т-лимфоцитов. Данное повышение, вероятно, связано с недостаточной стабилизацией барьерной функции плаценты и повышенным уровнем антигенов плодового происхождения в кровотоке матери. Рост уровня эффекторных клеток памяти может способствовать повторному развитию цитотоксических реакций в отношении плаценты и плода, и рецидиву угрожающего выкидыша во втором триместре беременности.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Beaman R. D., Ntrivalas E., Mallers T. M., Kwak-Kim J., Gilman-Sachs A. Am. J. Reprod. Immunol. 2012, 67 (4), 319-325.



## FEATURES OF THE MAINTENANCE OF NAIVE CELLS AND T-MEMORY CELLS IN POPULATIONS OF T-HELPER AND CYTOTOXIC T-LYMPHOCYTES AT RECURRENCE OF THE MENACING HABITUAL ABORTION

Ivanenkova N. I., Borzova N. Yu., Sotnikova N. Yu., Kadyrova L. V.

V. N. Gorodkov Federal State Research Institute of Maternity and Childhood  
Ministry of Health of the Russian Federation, Ivanovo, Russia

The assessment of the content of naive and memory T-cells in populations of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> lymphocytes in the subgroups of women with recurrence and without recurrence of the menacing habitual abortion in the second trimester of pregnancy was carried out. Significant increase in the population of CTL Tem cells in the subgroup of patients with repeated threat of interruption in comparison with a similar indicator in subgroup without recurrence of the menacing abortion was determined that allowed to develop a method for predicting the relapse of threatening abortion in the second trimester in women with recurrent pregnancy loss.

*Key words:* recurrent abortion, T-cells memory.

---

---

## РОЛЬ ИММУНОКОРРИГИРУЮЩЕЙ ТЕРАПИИ В ПРЕГРАВИДАРНОЙ ПОДГОТОВКЕ ЖЕНЩИН, ИМЕВШИХ В АНАМНЕЗЕ ДЕТЕЙ С ПОРОКАМИ ЧЕЛЮСТНО-ЛИЦЕВОЙ ОБЛАСТИ

Иноятов А. Ш., Шаропов С. Г., Мусаходжаева Д. А.<sup>1</sup>,  
Мухсинова Л. А.

Бухарский медицинский институт; <sup>1</sup>Институт иммунологии АН РУз,  
Бухара, Ташкент, Узбекистан

Проводили обследование 75 женщин, родивших детей с пороками челюстно-лицевой области. У них было выявлено иммунодефицитное состояние, глубина которого зависела от влияния тератогенных факторов. В прегравидарную подготовку была предложена схема лечения с включением иммунокорректирующей терапии. Анализ проведенного исследования показал, что в результате проведенного лечения из 75 женщин 68 родили детей без пороков.

*Ключевые слова:* пороки челюстно-лицевой области, иммунодефицитное состояние, прегравидарная подготовка.

Главным фактором в развитии здорового, полноценного плода, является здоровой образ жизни, причем не только во время беременности, но и до её наступления, на этапе планирования. От качества этого мероприятия зависит не только успех самого зачатия, но развитие самой беременности, родов и здоровья ребенка на протяжении всей его дальнейшей жизни [2, 4]. Рождение детей с врожденной патологией является универсальным ответом организма женщины на любое неблагоприятное изменение внешней и внутренней среды и многие

другие факторы [1, 3]. Установить истинную причину этого не всегда удается. Углубленное изучение особенностей репродуктивного здоровья в результате воздействия различных факторов может явиться ключом для устранения возможных причин врожденной патологии при последующих беременностях.

Целью данного исследования явилось изучение факторов риска рождения детей с врожденными расщелинами губы и неба для разработки индивидуального подхода к стратегии проведения корректирующих мероприятий

и профилактики развития врожденных пороков челюстно-лицевой области.

**Материалы и методы исследования.** Нами были обследованы 186 женщин, имевших детей с врожденными расщелинами губы и неба (ВРГН). Для анализа причины развития врожденных пороков были изучены клинично-анамнестические данные и проведены иммунологические исследования этих женщин. 20 женщин, не имевшие в анамнезе развитие врожденных пороков, составили контрольную группу. Иммунологические исследования проводились у 75 женщин, с изучением субпопуляционной структуры (CD3, CD4, CD8, CD16, CD20) лимфоцитов периферической крови (ПК) методом флуоресцентной микроскопии с помощью моноклональных антител серии LT (ТОО «Сорбент», Москва, Россия) и уровня про- и противовоспалительных цитокинов (IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-10, IFN $\gamma$ ) методом иммуноферментного анализа с использованием тест-систем ООО «Цитокин» (С-Пб, Россия). Статистическую обработку данных проводили с помощью программного пакета Statistica 5.1. Для анализа различий применяли *t*-критерий Стьюдента.

**Результаты и их обсуждение.** Исследования показали, что частота развития врожденных пороков в Бухарской области составляет 7,8%. В структуре врожденных пороков расщелина губы и неба регистрируется в 18,9% случаев. Было выявлено, что в Навоийнской области на 620 новорожденных приходится 1 случай рождения ребенка с ВРГН ( $\lambda=1,62$ ). В Бухарской области – на 890 новорожденных – 1 случай рождения ребенка с ВРГН ( $\lambda=1,12$ ). Левосторонние расщелины встречались в 2 раза чаще, чем правосторонние, у мальчиков в 2,5 раза чаще, чем у девочек.

У детей с врожденными расщелинами верхней губы и неба в Бухарской области преобладали наиболее тяжелые формы – врожденные расщелины неба – в среднем, 39,35%, и комбинированные расщелины верхней губы, альвеолярного отростка, твердого и мягкого неба – в среднем, 34,92%. У этих детей выявлена высокая соматическая заболеваемость, которая выше среднего значения заболеваемости по Республике.

Проведенные иммунологические исследования показали, что у женщин, родивших младенцев с врожденной расщелиной губы и неба, параметры иммунной системы достоверно

различались по сравнению с данными женщин, родивших детей без патологии. Было выявлено, что у женщин, родивших детей с ВРГН и имевших контакт с ксенобиотиками, уровень IL-4 в 1,5 раза был ниже, а IL-6 – в 1,7 раза выше, чем у женщин, родивших детей без пороков ( $P<0,01$ ). У женщин с наличием инфекционного анамнеза уровень лимфоцитов с рецептором к апоптозу повышен в 1,6 раза ( $P<0,01$ ), концентрация IFN $\gamma$  и IL-10 – снижены в 1,5 раза ( $P<0,05$ ). У женщин с сочетанными тератогенными факторами наблюдается достоверное снижение уровня CD3<sup>+</sup>- и CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов ( $P<0,01$ ), повышение числа киллерных клеток и провоспалительных цитокинов (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6) ( $P<0,01$ ).

Таким образом, проведенный анализ показал, что основными тератогенными факторами в развитии ВПЧЛО являются факторы, загрязняющие окружающую среду (25,8%), инфекционный анамнез в сочетании с воспалительными заболеваниями (22,0%), наследственная отягощенность (15,0%), лекарственные средства, обладающие тератогенным действием (16,1%), а также сочетанное действие тератогенных факторов (21,0%). Иммунная система меняется в зависимости от разнообразных и специфически различающихся тератогенных факторов, на которые организм отвечает повышением частоты развития внутриутробных аномалий плода в виде расщелины губы и неба.

По результатам изучения распространенности, структуры, факторов риска развития пороков челюстно-лицевой области и иммунологических исследований была разработана концепция профилактики врожденных пороков челюстно-лицевой области, которая позволила снизить их развитие.

Прегавитарная подготовка у женщин, на которых оказывалось воздействие ксенобиотиков, проводилась с включением иммунокорректирующего препарата Актиос на фоне приема фолиевой кислоты. В этой группе положительным результатом было рождение здоровых детей у 85,4% женщин.

В группе женщин с отягощенным инфекционным анамнезом прегавитарная подготовка включала прием противовирусных препаратов на фоне приема фолиевой кислоты. Эффективность данной схемы лечения – 73,0% женщин родили здоровых детей.

В группе женщин, на которых оказывалось сочетанное действие тератогенных факторов,

таких как контакт с ксенобиотиками, отягощенная наследственность, в прегравидарную подготовку включали: фолиевую кислоту, иммунокорректирующий препарат Актиос. При наличии ТОРЧ-инфекций – противовирусные препараты. В этой группе эффективность лечения – 61,1% женщин родили здоровых детей.

Таким образом, разработанная программа профилактики врожденных пороков челюстно-лицевой области в зависимости от вида тератогенных факторов, научно обоснованная результатами исследования, явилась эффективным инструментом для применения

лечения женщин репродуктивного возраста в целях снижения частоты ВПЧЛО в Бухарской области.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алиева Д. А., Матчанова А. Т., Хмелевская Е. О. Педиатрия (узб). – 1999. – Спец. Вып. – С. 86.
2. Иноятлов А. К., Азимов М. И., Абдурахманов М. М. Российский иммунологический журнал, 2012, т. 6 (14), № 2 (1), С.121-124
3. Медведовская Н. М. Институт стоматологии. – 2003. – № 1. – С.73-77.
4. Шарипова М. К. Педиатрия. – № 3-4. – 2003. – с. 24-28.

### THE ROLE OF IMMUNOTHERAPY IN PREGRAVID PREPARATION OF WOMEN WITH A HISTORY OF CHILDREN WITH MALFORMATIONS OF THE MAXILLOFACIAL AREA

Inoyatov A. Sh., Sharopov S. G., <sup>1</sup>Musakhodzhayeva D. A., Mukhsinova L. A.

*Bukhara Medical Institute; <sup>1</sup>Institute of Immunology, Academy of Sciences of Uzbekistan, Bukhara, Tashkent, Uzbekistan*

There was conducted a survey of 75 women, who gave birth to children with malformations of the maxillofacial area. There has been identified the immunodeficiency, the extent of which depended on the influence of teratogens. In pregravid training there was offered the treatment regimen with including of immunotherapy. The analysis of the study showed that as a result of the treatment, 75 women gave birth to 68 children without defects.

*Key words:* malformations of the maxillofacial area, immunodeficiency, pregravid training.

---

### ЗАВИСИМОСТЬ ФЕНОТИПА ЭНДОМЕТРИАЛЬНЫХ МАКРОФАГОВ ОТ ИХ ЛОКАЛИЗАЦИИ У ПАЦИЕНТОК С ЛЕЙОМИОМОЙ

Кирсанов А. Н., Малышкина А. И., Воронин Д. Н.,  
Нагорный С. Н., Анциферова Ю. С.

*ФГБУ «Ивановский НИИ материнства и детства им. В. Н. Городкова»  
Минздрава России, Иваново*

Установлено, что в эндометрии, локализованном в непосредственной близости от опухоли, снижено содержание «классических» CD14<sup>high</sup>CD16<sup>-</sup> макрофагов и повышен уровень «промежуточных» CD14<sup>high</sup>CD16<sup>low</sup> макрофагов. В тех случаях, когда структура миоматозного узла по данным МРТ была однородной, в эндометрии, находящимся под этими узлами, резко повышалось содержание «неклассических» макрофагов, а у тех пациенток, у которых в ткани миомы были выявлены участки выраженной дегенерации, в эндометрии, прилегающем к миоматозному узлу, наблюдалось увеличение макрофагов «промежуточного» типа.

*Ключевые слова:* лейомиома, эндометрий, макрофаги, фенотип

Лейомиома, представляющая собой доброкачественную опухоль миометрия, относится к наиболее распространенным гинекологическим заболеваниям [1]. Традиционно считается, что эстрогены и прогестерон являются главными факторами, участвующими в развитии и росте миоматозных узлов в мышечной стенке матки, однако данные последних лет указывают на важную роль других механизмов, в частности иммунных, в патогенезе лейомиомы [1]. Установлено, что увеличение размеров миомы матки сопровождается значительным повышением синтеза в ткани опухоли большого числа провоспалительных цитокинов, хемокинов и факторов роста [1], что позволило выдвинуть гипотезу о непосредственной связи патогенеза миомы матки с хроническим иммунным воспалением. В пользу этого предположения свидетельствуют данные о том, что усиленная продукция провоспалительных цитокинов в миоматозных узлах прямо коррелирует с инфильтрацией опухолевой ткани макрофагами [2]. Кроме того, в строме эндометрия, находящегося в непосредственной близости от миоматозных узлов, также была выявлена усиленная инфильтрация макрофагами [3]. Можно предположить, что пул тканевых макрофагов, в том числе и эндометриальных, играет важную роль в формировании специфического микроокружения в матке, которое способствует развитию и быстрому росту миомы. Однако до сих пор характер функционирования эндометриальных макрофагов при лейомиоме остается малоизученным. Нет данных о взаимосвязи между уровнем активации тканевых макрофагов и особенностями структуры самого миоматозного узла. В связи с этим, целью нашего исследования было установить особенности содержания макрофагов с различным уровнем мембранной экспрессии CD14 и CD16 молекул (CD14<sup>high</sup>CD16<sup>-</sup>, CD14<sup>high</sup>CD16<sup>low</sup>, CD14<sup>low</sup>CD16<sup>high</sup>) в эндометрии пациенток с лейомиомой в зависимости от места локализации эндометрия и от структуры ткани опухоли для уточнения иммунных механизмов роста миомы. Было проведено обследование биоптатов эндометриальной ткани 22 пациенток с лейомиомой матки больших размеров (диаметр узла более 7 см). У каждой пациентки эндометрий забирался из двух мест – в проекции миоматозного узла и с противоположной стенки матки. Эндометрий 10 здоровых фертильных женщин использо-

вался в качестве контроля. Всем пациенткам с миомой матки проводилось МРТ исследование органов малого таза с оценкой количества миоматозных узлов, их расположения и определением сигнальных характеристик узлов (узлы с различными типами дегенераций, типичные миомы без дегенерации, лейомиомы клеточного типа). Исследования выполнялись на магнитно-резонансном томографе GE Signa HDxt с индукцией магнитного поля 1,5 Тл. Выделение популяции мононуклеарных клеток (МНК) из эндометрия проводили стандартным безферментативным методом с последующим центрифугированием в градиенте плотности фиколл-урографина. Мембранную экспрессию CD14 и CD16 молекул оценивали с помощью моноклональных антител (mAb) в макрофагальном гейте (Beckman Coulter, USA) методом проточной цитометрии на приборе FACSCanto II (Becton Dickinson, USA). Анализ результатов проводили в программе FACSDiva (Becton Dickinson, USA). По нашим данным, мембранная экспрессия CD16 молекул в пуле макрофагов, выделенных из эндометрия, находящегося вдали от миоматозного узла, не отличалась значительно от показателей контрольной группы. Для макрофагов, инфильтрирующих эндометрий, локализованный в непосредственной близости от опухоли, было характерно значительное снижение пула так называемых «классических» макрофагов, имеющих фенотип CD14<sup>high</sup>CD16<sup>-</sup>, с одновременным повышением макрофагов «промежуточного» типа, с фенотипом CD14<sup>high</sup>CD16<sup>low</sup>. Согласно данным последних лет, популяция моноцитов/макрофагов является гетерогенной по ко-экспрессии на их поверхности молекул CD14 и CD16. Пул «классических» CD16-негативных макрофагов, основной функцией которых является фагоцитоз, характеризуется высоким уровнем экспрессии хемокиновых рецепторов, молекул адгезии, продукцией цитокинов и хемокинов в ответ на ЛПС, что определяет их важную роль в регуляции воспалительных процессов [4]. Макрофаги «промежуточного» типа рассматриваются многими авторами как клетки, находящиеся на переходной стадии между «классическими» и «неклассическими» пулами. Но есть мнение, что они обладают повышенной способностью к продукции IL-1 $\beta$  и TNF $\alpha$  в ответ на ЛПС и являются маркерами хронического и острого воспаления [4]. Аккумуляция макрофагов

«промежуточного» типа в эндометрии, локализованным в непосредственной близости от миоматозного узла, вероятно, может определять формирование воспалительного микроокружения, благоприятного для развития и роста опухоли. При проведении дифференцированного анализа субпопуляций эндометриальных макрофагов в зависимости от характеристики ткани миомы, полученной при поведении МРТ, было установлено, что в тех случаях, когда структура узла была однородной, близкой по характеристикам к миометрию, в эндометрии, находящимся под этим узлом, резко повышалось содержание «неклассических» CD14<sup>low</sup>CD16<sup>high</sup> макрофагов. У тех пациенток, у которых в ткани миомы были выявлены участки выраженной дегенерации и имелись признаки геморрагии, в эндометрии, прилегающем к миоматозному узлу, наблюдалось увеличение макрофагов «промежуточного» типа. По данным литературы, «неклассические» макрофаги обладают преимущественно регуляторными свойствами, снижают экспансию «классических» моноцитов и Т-лимфоцитов, стимулируют ангиогенез и процессы репарации, связанные с выработкой компонентов внеклеточного матрикса [4]. Как известно, миома состоит из гладкомышечных клеток и большого количества внекле-

точного матрикса [1]. Согласно полученным нами данным, в непосредственной близости от узлов однородной структуры доминирует активность «неклассических» макрофагов, обладающих способностью к индукции синтеза коллагена, фибронектина и других компонентов внеклеточного матрикса. Рядом с опухолевой тканью, имеющей признаки дегенерации и геморрагии, находились преимущественно макрофаги «промежуточного» фенотипа, ассоциированные с воспалением. Таким образом, результаты нашего исследования позволяют говорить о том, что активность эндометриальных макрофагов, локализованных вблизи от миоматозного узла, соотносится с процессами, происходящими непосредственно в ткани опухоли.

(Работа поддержана грантом РФФИ № 15-04-05042)

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Chegini N. Semin. Reprod. Med. 2010, 28 (3), 180-203.
2. Miura S, Khan KN, Kitajima M, et al. Hum Reprod. 2006, 21 (10). 2545-2554.
3. Kitaya K., Yasuo T. Hum. Immunol. 2010, 71 (2), 158-163.
4. Yang J, Zhang L, Yu C, et al. Biomark Res. 2014, 2 (1), 1.

### DEPENDENCE OF ENDOMETRIAL MACROPHAGES' PHENOTYPE ON THEIR LOCALIZATION IN PATIENTS WITH LEIOMYOMAS

**Kirsanov A. N., Malyshkina A. I., Voronin D. N.,  
Nogornii S. N., Antsiferova Yu.S.**

*V. N. Gorodkov Federal State Research Institute  
of Maternity and Childhood, Ivanovo, Russia*

It was found that the endometrium localized with neighboring leiomyomas nodule is characterized by the decrease of the amount of classical CD14<sup>high</sup>CD16<sup>-</sup> macrophages and the increase of the level of intermediate CD14<sup>high</sup>CD16<sup>low</sup> macrophages. In cases when myomas' structure was homogenous according to MRI data, the level of non-classical macrophages was significantly increased in the endometrium with neighboring leiomyoma, whereas in patients with degenerating leiomyomas the elevation of the intermediate type of macrophages was noted in the endometrium with neighboring nodule.

## ОЦЕНКА ФАКТОРОВ ГУМОРАЛЬНОГО И ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА ЖЕНЩИН, ПРЕРВАВШИХ БЕРЕМЕННОСТЬ В РАННИЕ СРОКИ ГЕСТАЦИИ ПОСЛЕ ЭКСТРАКОРПОРАЛЬНОГО ОПЛОДОТВОРЕНИЯ

Кожекина Ю. Н., Ремизова И. И., Чистякова Г. Н.,  
Газиева И. А.

ФГБУ «НИИ ОММ» Минздрова России, Екатеринбург, Россия

Проведена оценка гуморального иммунитета и неспецифических фактов защиты в ранние сроки беременности 48 женщин, программа ЭКО которых завершилась наступлением беременности и закончилась срочными родами и 12 женщин после ЭКО, беременность которых прервалась в сроке до 12 недель. Особенностью пациенток с неблагоприятным исходом беременности после процедуры ЭКО является увеличение процентного содержания индуцированных  $CD3^+IFN-\gamma^+$  -клеток, повышение значения индекса поляризации ( $CD3^+IFN-\gamma^+/CD3^+IL-4^+$ ) и снижение метаболической активности нейтрофилов при стимуляции.

**Ключевые слова:** экстракорпоральное оплодотворение, прерывание беременности, цитокины.

В настоящее время известно, что около 80% ранее необъяснимых случаев повторных потерь беременности связано с нераспознанными иммунологическими нарушениями [1]. Согласно данным литературы, при вовлечении иммунных механизмов в патогенез многократных ранних потерь беременности, шанс успешного вынашивания без терапии после трех выкидышей составляет 30%, после четырех – 25%, после пяти – 5% [2, 3].

**Цель исследования:** оценить показатели гуморального иммунитета и неспецифических фактов защиты в ранние сроки беременности, наступившей в результате ЭКО, в зависимости от ее исхода.

**Материал и методы.** Проведено иммунологическое обследование 60 женщин с беременностью, наступившей в результате ЭКО, подразделенных на две группы, в зависимости от ее исхода: 1-я группа – 48 женщин, программа ЭКО которых завершилась наступлением беременности и закончилась срочными родами; 2-я группа – 12 женщин после успешной процедуры ЭКО, беременность которых прервалась в сроке до 12 недель. Группу сравнения составили 28 женщин со спонтанно наступившей беременностью, завершившейся рождением живого здорового ребенка.

Исследование проводили после подтверждения факта наступления прогрессирующей беременности (в сроке 5–6 недель) с помощью УЗИ и определения содержания  $\beta$ -ХГЧ в сыворотке крови. Количественное определение уровней сывороточных иммуноглобулинов классов А, М, G проводили методом радиальной иммунодиффузии в агаровом геле по G. Mancini et al. (1965). Концентрацию циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) оценивали по методу V.J. Haskova et al. (1978) в модификации Ю. А. Гриневич (1981). Определение уровня комплемента (СН50) сыворотки крови проводили методом титрования по 50% гемолизу по Л. С. Резниковой (1967). Результаты оценивали в условных единицах гемолитической активности. Оценку продукции внутриклеточных цитокинов  $IFN-\gamma$  и  $IL-4$  Т-лимфоцитами осуществляли методом проточной лазерной цитофлуориметрии на анализаторе «FACS Calibur» фирмы «Becton Dickinson» (США) с использованием наборов моноклональных антител того же производителя. Уровень  $IFN-\gamma$  и  $IL-4$  в сыворотке крови определяли методом ИФА с помощью реагентов ЗАО «Вектор-Бест» (Россия). Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета прикладных про-

грамм «Statistica for Windows 6.0». Данные представляли в виде медианы (Me), верхнего (P25) и нижнего (P75) квартилей. Определение межгрупповых различий осуществляли с помощью непараметрического U-критерия Манна-Уитни (уровень значимости различий принимали  $p \leq 0,017$ ).

**Результаты и обсуждение.** Все обследованные женщины были сопоставимы по возрасту, акушерско-гинекологическому анамнезу. Значимых различий в содержании сывороточных иммуноглобулинов у женщин сравниваемых групп не выявлено, за исключением пациенток 1-й группы, у которых содержание IgG на уровне тенденции превышало показатели группы сравнения (13,63 (11,0–16,0) г/л против 11,13 (10,5–13) г/л,  $p_{1-3}=0,028$ ). Показатель общей комплементарной активности системы комплемента (CH50) у всех обследованных женщин был в пределах допустимых значений и статистически значимо не отличался. Отмечалось статистически значимое снижение уровня ЦИК у женщин 1-й группы с (40,0 (27,0–53,5) у.е. против 65,0 (47,25–84,75) у.е. 3-й группы  $p_{1-3}=0,008$ ), что свидетельствует об адекватной элиминации антигенов плодового происхождения из материнского кровообращения. Другим гуморальным фактором врожденного иммунитета, оказывающим существенное влияние на пролонгирование беременности, является продукция цитокинов. При оценке содержания цитокин-продуцирующих клеток в спонтанном тесте было установлено, что в сроке 5–6 недель беременности, количество Т-лимфоцитов, продуцирующих IFN- $\gamma$  и IL-4 у всех обследованных женщин, статистически значимо не отличалось. Относительное количество стимулированных Т-лимфоцитов, экспрессирующих IFN- $\gamma$  у пациенток 1-й группы не отличалось от аналогичных параметров у женщин со спонтанной беременностью 5,96 (4,21–8,63)% против 6,13 (4,24–8,51)%, а уровень экспрессии IL-4 был статистически значимо выше (6,09 (4,31–9,04)% против 5,25 (3,10–6,33)%,  $p_{1-3}=0,002$ ). У пациенток с неблагоприятным исходом беременности содержание стимулированных CD3<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>- и CD3<sup>+</sup>IL-4<sup>+</sup>-клеток в 1,7 и 1,2 раза превышало значения у группы сравнения (10,62 (4,93–17,77) и 6,51 (5,29–9,77)%,  $p_{2-3}=0,01$  и  $p_{2-3}=0,006$  соответственно), что указывало на значимый функциональный резерв иммунной системы в отношении синтеза, как провос-

палительных, так и регуляторных цитокинов. Известно, что при патологически протекающей беременности не происходит активации иммунной системы в направлении синтеза цитокинов Th2-типа, которые и оказывают модулирующее влияние на Th1-зависимый иммунный ответ. Усиленная продукция цитокинов Th-1 типа и сниженная – цитокинов Th-2 типа может приводить к нарушению дифференцировки и инвазии трофобласта с развитием угрозы прерывания беременности [4]. Необходимо отметить, что, несмотря на отсутствие снижения количества клеток, экспрессирующих IL-4, соотношение популяций, продуцирующих про- и противовоспалительные цитокины в этой группе женщин, было статистически значимо выше аналогичных значений у пациенток 1-й и 3-й групп (1,58 (1,14–2,01) у.е. против 0,91 (0,67–1,20) у.е., соответственно,  $p_{1-2}=0,012$ ,  $p_{2-3}=0,017$ ). Уровень регуляторного IL-4 в сыворотке крови у пациенток 1-й и 2-й групп был существенно ниже показателей у женщин со спонтанной беременностью (0,65 (0,21–1,13) пг/мл и 0,13 (0,12–0,86) пг/мл против 1,90 (1,42–2,83) пг/мл,  $p_{1-3}=0,01$ ,  $p_{2-3}=0,017$ ).

**Заключение.** Таким образом, иммунологические исследования показали, что у всех женщин после ЭКО в ранние сроки беременности отмечается увеличение содержания стимулированных Т-клеток, экспрессирующих IL-4, сопровождающееся снижением уровня сывороточного IL-4. Особенностью пациенток с неблагоприятным исходом беременности после процедуры ЭКО является увеличение процентного содержания индуцированных CD3<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>-клеток, повышение значения индекса поляризации (CD3<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup>IL-4<sup>+</sup>) и снижение метаболической активности нейтрофилов при стимуляции, у пациенток с благоприятным исходом – снижение уровня ЦИК.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Сотникова Н.Ю. Бюллетень Сибирского отделения Российской академии медицинских наук. Приложение. – 2008. – № 1. – С. 69–74.
2. Радзинский В.Е., Димитрова В.И., Майскова И.Ю. Неразвивающаяся беременность – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. – 200 с.
3. Polgar B., Nagy E., Mikor Er., Var-ga P., Szekeres J. Barthor Biol. Reprod. – 2004. – 71. – P.1699–1705.
4. Говалло В.И. Иммунология репродукции. – М., 1987. – 304 с.

## EVALUATION OF HUMORAL AND INNATE IMMUNITY FACTORS IN WOMEN WITH PREGNANCY TERMINATION IN THE EARLY GESTATION AFTER IN VITRO FERTILIZATION

Kozhekina J. N., Remizova I. I., Chistyakova G. N., Gazieva I. A.

*Mother and Child Care Ural Research Institution of Russia Public Health Ministry,  
Yekaterinburg, Russia*

The evaluation of humoral immunity and nonspecific evidence of protection in early pregnancy of 48 women who completed the IVF program for pregnancy and birth in time and 12 women after IVF, whose pregnancy was terminated in the period up to 12 weeks, was carried out. The pattern of patients with adverse pregnancy outcomes after IVF is the induced increase in the percentage of CD3<sup>+</sup> FN- $\gamma$ <sup>+</sup> -cells, elevation of the polarization index (CD3<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup>IL-4<sup>+</sup>) and decrease in the metabolic activity of neutrophils upon stimulation.

*Keywords:* *in vitro* fertilization, abortion, cytokines.

---

---

## ДИФФЕРЕНЦИРОВКА ПЕРЕФЕРИЧЕСКИХ Т-ЛИМФОЦИТОВ ПРИ ЭКСТРАКОРПОРАЛЬНОМ ОПЛОДОТВОРЕНИИ

Кудряшова А. В., Мишарина Л. В., Астраух Н. В.,  
Васильева И. А., Полумискова Е. В., Воронцов Д. М.

*Федеральное государственное бюджетное учреждение «Ивановский научно-исследовательский институт материнства и детства имени В. Н. Городкова»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Иваново, Россия*

Методом проточной цитофлуориметрии в периферической крови исследовали содержание наивных клеток (Tn), центральных (Tcm), претерминально- (Tem) и терминально-дифференцированных (Temra) клеток памяти в популяциях CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> лимфоцитов женщин с трубно-перитонеальным бесплодием в динамике программы ЭКО, беременных в 1 триместре гестации и небеременных доноров. Вне беременности для всех женщин, независимо от эффективности ЭКО, был характерным высокий уровень Temra в популяции CD8<sup>+</sup> клеток. После проведения индукции суперовуляции у женщин с бесплодием эффективность ЭКО ассоциировалась с повышением уровня CD4<sup>+</sup> Tn, неэффективность – с повышением содержания Temra в популяциях CD8<sup>+</sup> и CD4<sup>+</sup> клеток.

*Ключевые слова:* Т-лимфоциты, наивные клетки, клетки памяти, ЭКО.

В настоящее время накоплены многочисленные данные о характере гормональной регуляции иммунных реакций, в том числе при беременности. Нарушение тех или иных звеньев в сложной цепочке иммунорегуляции часто ассоциируется с возникновением патологических процессов в системе мать-плацента-плод и бесплодием [1]. В связи с этим, исследуя особенности иммунных реакций при экстракорпоральном оплодотворении (ЭКО) следует учитывать исходное состояние иммунной и эндокринной систем женщины, а также ха-

рактер влияния проводимой индукции суперовуляции на состояние врожденного и адаптивного иммунитета. Кроме того, изменение уровня эстрогенов во время беременности вызывает транзиторную инволюцию тимуса, характеризующуюся снижением его массы и клеточности в результате истощения популяции кортикальных лимфоцитов [2]. В то же время, иммунная система женщины подвергается длительному воздействию факторов, способных вызывать развитие специфического иммунного ответа. Все эти факты позволили



нам предположить наличие особого характера дифференцировки Т-лимфоцитов от состояния наивных клеток до формирования пулов клеток памяти.

Целью проведенного исследования было установить особенности содержания наивных клеток (Тn), центральных (Тсм), претерминально-дифференцированных (Тем) и терминально-дифференцированных (Темга) клеток памяти в популяциях периферических Т-хелперов (CD4<sup>+</sup>) и цитотоксических Т-лимфоцитов (CD8<sup>+</sup>) у женщин, участвующих в программе ЭКО.

Материалом для исследований служила периферическая венозная кровь 50 женщин. Из них 20 соматически здоровых небеременных женщин с реализованной репродуктивной функцией (доноры); 20 женщин, с самостоятельно наступившей беременностью, обследованных в 5 недель гестации, с неосложненным течением гестационного процесса на всем ее протяжении (контрольная группа), а также 17 пациенток, проходивших лечение методом ЭКО в отделении вспомогательных репродуктивных технологий ФГБУ «Ивановский научно-исследовательский институт материнства и детства имени В. Н. Городкова» Минздрава России. Из 17 обследованных женщин у 10 женщин в результате ЭКО наступила беременность. Забор крови у женщин в группе с ЭКО проводился трижды: до вступления в программу ЭКО, на фоне индукции супероуляции и на 14 день после переноса эмбриона. Критериями включения пар в исследование было: трубно-перитонеальный фактор бесплодия, возраст женщины не более 35 лет, нормальный овариальный резерв, число предшествующих неудачных циклов ЭКО не более 2.

Методом трехцветной проточной цитофлюориметрии в популяциях CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> лимфоцитов исследовали содержание наивных клеток (CD62L<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>), центральных (CD62L<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>), претерминально-дифференцированных (CD62L<sup>-</sup>CD45RA<sup>-</sup>) и терминально-дифференцированных (CD62L<sup>-</sup>CD45RA<sup>+</sup>) клеток памяти на цитометре FACS Canto II с использованием программного обеспечения FACSDiva (Becton Dickinson, США). Статистическая обработка данных проводилась с использованием программы Microsoft Excel из комплекта Microsoft Office 2000.

Результаты проведенных исследований показали, что вне беременности группы с ЭКО,

независимо от исхода, в популяции Тh не имели достоверных различий в содержании наивных клеток и клеток памяти, находящихся на различных этапах дифференцировки, по сравнению с показателями у группы доноров. До ЭКО в популяции CD8<sup>+</sup> лимфоцитов в обеих группах уровень Темга был достоверно повышен ( $p < 0,05$  при неэффективном ЭКО и  $p < 0,001$  при эффективном ЭКО), а уровень Тем был снижен ( $p < 0,01$  при неэффективном ЭКО и  $p < 0,001$  при эффективном ЭКО) по сравнению с показателями доноров. Все перечисленные показатели не имели достоверных различий в двух группах с ЭКО до индукции супероуляции. После индукции супероуляции в группе с эффективным ЭКО было выявлено только достоверное снижение уровня CD4<sup>+</sup> Тсм ( $p < 0,05$ ) на фоне тенденции к повышению содержания CD4<sup>+</sup> Тn по сравнению с исходными значениями данных показателей. В группе с неэффективным ЭКО индукция супероуляции вызывала (на уровне выраженной тенденции) повышение уровня CD4<sup>+</sup> Тем и Темга, CD8<sup>+</sup> Темга, на фоне снижения содержания CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Тсм по сравнению с исходным уровнем. Причем уровень CD8<sup>+</sup> Тсм в группе с неэффективным ЭКО был достоверно снижен по сравнению с показателями при эффективном ЭКО ( $p < 0,01$ ). Обследование женщин, проведенное после наступления беременности, показало, что успешное ЭКО и наступление беременности сочетались с тенденцией к повышению уровня Тh в обеих популяциях CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> лимфоцитов, и снижением уровня CD4<sup>+</sup> Тсм, по сравнению с исходным уровнем вне беременности, а также с достоверным увеличением уровня Тем клеток и снижением Тсм в популяции CD4<sup>+</sup> клеток ( $p < 0,05$  в обоих случаях), по сравнению с показателями женщин, у которых беременность наступила самостоятельно. Как показывают многочисленные исследования, эффективность ЭКО определяется особенностями состояния иммунной системы женщин [4]. Результаты наших собственных исследований свидетельствуют о не менее важном компоненте для эффективности ЭКО – адекватном ответе на гормональную стимуляцию. По нашим данным, для всех женщин с ЭКО был характерен высокий уровень терминально-дифференцированных клеток памяти в популяции CD8<sup>+</sup> клеток, что, возможно, определялось наличием хронического инфекционного процесса при трубном бесплодии. Благоприятный исход ЭКО отмечался в тех случаях, когда уже

на этапе индукции суперовуляции рос уровень наивных CD4<sup>+</sup> лимфоцитов, а впоследствии, после наступления беременности, возрастал и уровень CD8<sup>+</sup> Tn клеток. Аналогичное повышение уровня наивных CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> клеток мы отмечали в 1 триместре неосложненной беременности [5], вероятно, в результате роста уровня наивных Treg. Неблагоприятный исход ЭКО ассоциировался с повышением после индукции суперовуляции не только уровня CD8<sup>+</sup> Temra, но и терминально-дифференцированных клеток памяти в популяции Т-хелперов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кудряшова А. В., Сотникова Н. Ю., Панова И. А., Кадырова Л. В. Журнал акушерства и женских болезней, 2013, LXII, 2, 110-116.
2. Germain S. J., et al. J. Immunol, 2007, 178, 5949-5956.
3. Abo T., Kawamura T., Watanabe H. Rev. Immunol, 2000, 174, 135-149.
4. Николаева М. А., Степанова Е. О., Бабаян А. А. и др. Акушерство и гинекология, 2014, 4.
5. Кадырова Л. В., Сотникова Н. Ю., Кудряшова А. В. Российский иммунологический журнал, 2014, 8 (17), 1, 54-60.

## DIFFERENTIATION OF PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES DURING IN VITRO FERTILIZATION

**Kudryashova A. V., Misharina L. V., Astraukh N. V., Vasilyeva I. A., Polumiskova E. V., Vorontsov D. M.**

*V. N. Gorodkov Federal State Research Institute of Maternity and Childhood, Ivanovo, Russia*

The level of the naïve (Tn), central (Tcm), preterminal (Tem) and terminally-differentiated (Temra) memory cells in the populations of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> peripheral blood lymphocytes of women with tubal factor of infertility in the dynamic of the IVF program, pregnant women in the first trimester of the gestation and non-pregnant donors was estimated by flow cytometry. In the group of women with tubal infertility before the IVF program onset the high level of Temra in the population of CD8<sup>+</sup> cells was seen. After the induction of the superovulation in women with tubal infertility the IVF success was associated with the elevation of the amount of CD4<sup>+</sup> Tn, and IVF failure – with the increase of the amount of Temra in the populations of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cells.

## НИЗКОИНТЕНСИВНОЕ ЛАЗЕРНОЕ ИЗЛУЧЕНИЕ В КОРРЕКЦИИ ДИСФУНКЦИЙ ФАКТОРОВ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА У ЖЕНЩИН С МИКОПЛАЗМЕННОЙ ИНФЕКЦИЕЙ

**Летяева О. И., Гизингер О. А., Зиганшин О. Р.,  
Нефедьева Ю. В., Прокопьев Д. С.**

*ГБОУ ВПО «Южно-Уральский государственный медицинский университет»  
Минздрава России, кафедра дерматовенерологии, Челябинск, Россия*

Применение лазера низкой интенсивности в составе комплексной терапии у пациентов с воспалительными заболеваниями, ассоциированными с микоплазмами, показало высокую клинико-иммунологическую эффективность, о чем свидетельствует нормализация уровня секреторной активности нейтрофильных гранулоцитов и разрешение симптомов воспаления.

*Ключевые слова:* низкоинтенсивный лазер, микоплазменная инфекция.

Вопросы терапии воспалительных заболеваний репродуктивной системы женщин имеют статус актуальной научной и клинической проблемы. Несмотря на то, что *U. urealyticum*,

*U. parvum* и *M. hominis* относятся к условно-патогенным микроорганизмам, частота их выявления у женщин с воспалительными заболеваниями мочевыводящих путей составляет от 18 до 50% при отсутствии облигатных патогенов, что свидетельствует об их этиологической значимости в развитии патологического процесса. Клинически чаще всего это проявляется уретритом (37-51%), цервицитом (27-56%) [1, 2]. Одной из причин, позволяющих реализовать патогенный потенциал условно-патогенных микроорганизмов, являются нарушения в системе врожденного иммунитета на уровне репродуктивной системы. Одним из методов коррекции дисфункций локальных факторов противоинфекционной защиты является использование физиотерапевтических методов, в частности низкоинтенсивного лазерного излучения [3, 4].

**Цель:** изучение влияния низкоинтенсивного лазерного излучения на факторы врожденного иммунитета репродуктивной системы женщин с микоплазменной инфекцией.

**Материалы и методы.** В исследование вошло 94 пациентки с воспалительным процессом репродуктивного тракта. Материалом для выявления микоплазм служили соскобы из цервикального канала, исследование проводилось методом ПЦР в режиме реального времени. Всем проведены иммунологические и микробиологические исследования цервикального секрета. Пациентки были разделены на две группы: 1 группа 54 женщины, которым помимо стандартной антибактериальной терапии была проведена лазеротерапия, 2 группа состояла из 40 женщин, получавших только базисную терапию. Базисная схема включала: джозамицин по 500 мг три раза в день № 10. Лечение больных с применением лазеротерапии осуществлялось на аппарате «Мустанг-2000». Мощность лазерного излучения на выходе излучателя составляло не менее 30 мВт, плотность мощности – 10 мВт/см<sup>2</sup>, длина волны – 0,632 мкм. Сеансы проводились в амбулаторных условиях, согласно «Санитарным нормам и правилам устройства и эксплуатации лазеров» № 5804-91. Лечение проводили с помощью полостной насадки, на которую предварительно надевался презерватив, экспозиция 10 минут. Курс лечения состоял из 10 процедур. Контрольную группу составили 50 женщин, отобранных при профилактических осмотрах. Материалом для исследования мест-

ного иммунитета репродуктивного тракта служила цервикальная слизь. Все исследования проводились в соответствии с существующими нормативными документами. Полученные результаты исследований были подвергнуты обработке методами вариационной статистики с помощью пакета прикладных программ «Statistica for Windows».

**Результаты и обсуждение.** В группе больных, получавших комплексную терапию, клинико-лабораторная эффективность терапии составила 98,1%. В группе пациенток, получавших только базисную терапию, этот показатель составил 90%. Характер изменений факторов врожденного иммунитета показал отчетливое снижение количества нейтрофильных гранулоцитов, повышение их функциональной активности, что проявлялось повышением активности в НСТ-тесте, усилением активности и интенсивности фагоцитоза, усилением выработки секреторных продуктов, в частности дефензинов, ВРІ, лактоферрина. У пациенток, получавших только базисную терапию, эти показатели были значительно ниже, чем в группе, где было использовано НИЛИ. Можно предположить, что это связано со стимуляцией локализованных в гранулах цитоплазмы ферментов, таких как NADPH-оксидаза, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа. Кроме того, это обстоятельство может свидетельствовать и об изменении функциональной активности мембранного аппарата фагоцитов под действием низкоинтенсивного лазера [2]. Динамическое наблюдение показало совпадение клинического улучшения течения заболевания с нормализацией иммунологических показателей. Возможно, что по мере освобождения организма от патогена остаётся больше возможностей для активации системы местного иммунитета репродуктивного тракта.

**Вывод:** НИЛИ в терапии воспалительных процессов, ассоциированных с микоплазмами, способствует разрешению клинических симптомов и восстановлению иммунологической реактивности репродуктивной системы.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Летяева О.И., Гизингер О.А., Зиганшин О.Р. // Клиническая дерматология и венерология. – 2011. № 4. – С. 95-100.
2. Летяева О.И., Гизингер О.А., Долгушин И.И. // Акушерство и гинекология. – 2013. – № 2. – С. 124-128.

3. Гизингер О. А., Летяева О. И., Зиганшина Т. А., Семенова И. В. // Вестник новых медицинских технологий. – 2011. Т 18. № 4. – С.8–12.
4. Биолог. модели и физ. механизмы лазерной терапии / В.М. Чудновский, Г.М. Леонова, С.А. Скопинов // Владивосток: Дальнаука. 2002. 157 с.

### LOW-LEVEL LASER THERAPY IN THE CORRECTION OF DYSFUNCTIONS OF INNATE IMMUNITY FACTORS IN WOMEN WITH MYCOPLASMA INFECTION

Letyaeva O. I., Gizinger O. A., Ziganchin O. R., Nefedieva Y. V., Prokopiev D. S.

*South Ural State Medical University" of Ministry of Health of the Russian Federation, Department of Dermatology, Chelyabinsk, Russia*

The application of low intensity laser in the complex therapy of patients with inflammatory diseases associated with Mycoplasma, showed high clinical and immunological efficacy, as evidenced by normalization of the secretory activity of neutrophil granulocytes and resolution of the symptoms of inflammation.

*Key words:* low intensive laser, mycoplasma infection.

### ОСОБЕННОСТИ СТРОЕНИЯ ТИМУСА В РАННИЙ ПЕРИОД ПОСТНАТАЛЬНОГО ОНТОГЕНЕЗА У ДЕТЕЙ С ВРОЖДЕННЫМ ПОРОКОМ СЕРДЦА

Логинова Н. П., Четвертных В. А., Хромцова Г. А.

*ГБОУ ВПО Пермский государственный медицинский университет им. академика Е. А. Вагнера Минздрава России, Пермь, Россия*

Представлены результаты исследования тканей тимуса у детей с ВПС. В течение года жизни (1 мес., 6 мес., 11 мес.) в органе развивается комплекс иммуноморфологических перестроек. Изменение в состоянии эпителиальной стромы приводило к образованию в коре телец Гассала. С ними тесно контактировали дендритные клетки (S-100<sup>+</sup>), выявляемые диффузно в пределах коры. На протяжении всего возрастного периода в цитоплазме корковых тимоцитов наблюдали стойкое увеличение антиапоптоического белка Bcl-2. Таким образом, изменение в состоянии ретикулоэпителиальной стромы может повлиять на этапы развития корковых тимоцитов, что отразится на качестве формирования адаптивного иммунитета у данной категории больных детей.

*Ключевые слова:* тимус, дендритные клетки, эпителиоретикулоциты, дети, врожденный порок сердца.

В норме тимус, как первичный орган иммунной системы, отвечает за развитие Т-лимфоцитов, формирование рециркулирующего пула этих клеток и создает оптимальные условия для антигеннезависимой дифференцировки Т-лимфоцитов [4, 5].

Тимус играет жизненно важную роль в эмбриональном периоде и сразу после рождения. У людей он имеет максимальную массу в возрасте 1 года, после чего начинается возрастная

инволюция, и ежегодно происходит потеря около 3% активной ткани тимуса.

Тимус чрезвычайно чувствителен к различным внешним и внутренним воздействиям. Нарушение его структуры, и, как следствие, функции при действии многих стрессорных факторов (ишемия, гипоксия, облучение, вирусная и бактериальная инфекция и т.д.) может определить дефектное состояние иммунной системы в целом, что особенно про-

является в детском возрасте. По данным литературы, дети с врожденным пороком сердца (ВПС) часто подвержены различным заболеваниям, в связи с имеющимся у них иммунным дисбалансом [1].

В патогенезе данного заболевания лежит механизм нарушения системной гемодинамики, ведущего к развитию тканевой гипоксии, что нарушает функцию органов и тканей, являясь одной из причин развития акцидентальной инволюции тимуса. Вопрос об иммуноморфологическом статусе тимуса на этапе постнатального онтогенеза в условиях циркуляторной гипоксии, обусловленной врожденными пороками сердца, на сегодня остается нерешенным.

**Цель работы** – изучить особенности строения тимуса у детей в течение первого года жизни на фоне врожденного порока сердца.

**Материалы и методы.** Исследование проведено на биоптатах тимуса ( $n=42$ ), полученных во время операций от детей, в возрасте до 11 мес., при коррекции врожденных пороков сердца. Тимэктомия проводилась в соответствии с существующей хирургической практикой Федерального краевого центра сердечно-сосудистой хирургии г. Перми. Исследования проводили согласно Хельсинской Декларации ВМА 2000 г. и протоколу Конвенции Совета Европы о правах человека и биомедицине 1999 г. Критериями включения явилось наличие добровольного согласия на обследование со стороны законных представителей несовершеннолетних детей. Исследование проводил в возрастной динамике: 1 месяц, 6 месяцев, 11 месяцев жизни.

В патогенезе большинства ВПС лежит механизм нарушения системной гемодинамики, вызывающий цианоз слизистых и кожных покровов, такие клинические проявления относятся к порокам синего типа. Тимусы изучали от детей с ВПС синего типа (тетрада Фалло; аномалия Эбштейна; транспозиция магистральных сосудов). В качестве группы сравнения, исследованы тимусы от случайно погибших детей ( $n=8$ ).

Биоптаты тимуса фиксировали в 10% нейтральном формалине на фосфатном буфере (рН 7,2). Оценка морфофункционального состояния тканей тимуса проводили с помощью окрашивания срезов гематоксилином-эозином. Иммуногистохимический анализ состояния клеток проводили моноклональными антителами (Daco, США): 1) CD68 – для

идентификации макрофагов; 2) S-100 – для выявления дендритных клеток; 3) виментин (vimentin) – для идентификации клеток мезенхимального происхождения.

Полученные результаты обработаны с помощью пакета Statistica 6,0. Для статистического анализа использовались непараметрические критерии. За статистически значимые результаты принималась величина ошибки  $p=0,05$ .

**Результаты и обсуждение.** В тимусах при ВПС синего типа на протяжении всего срока исследования (1мес – 6 мес – 11 мес) развивается комплекс морфологических перестроек. На фоне циркуляторной гипоксии в органе уже с 1 месяца определяются признаки нарушения кровообращения с явлениями гемостаза в кровеносных сосудах, кровоизлияний и диapedеза в окружающие ткани. В этих участках и во всех зонах дольки всегда верифицируются макрофаги (CD68<sup>+</sup>). Наиболее интенсивно они накапливаются в пределах глубокой зоны коры. В междольковых перегородках наблюдается развитие жировой ткани. И если в 1 мес адипоциты (vimentin<sup>+</sup>) представлены одиночными скоплениями, то к 11 мес доля жировой ткани (vimentin<sup>+</sup>) значительно увеличивается, вращая в дольки и тем самым замещает часть площади субкапсулярной зоны. В этих местах существенно нарушается структура паренхимы субкапсулярной зоны. Адипоциты и сосуды лежат в окружении S-100 позитивно окрашенных дендритных клеток, которые к 11 мес интенсивно накапливаются в междольковых перегородках.

В пределах коры на 1 месяце верифицируются дистрофически измененные эпителиоретикулоциты. Тела этих клеток увеличены в объеме, имеют неправильную форму и признаки дистрофических изменений. Ядра часто отечны и имеют неровности контура. К 11 мес от субкапсулярной зоны до мозгового вещества большая часть эпителиоретикулоцитов находится уже на стадии гибели. Начиная с 1 месяца, в пределах коркового вещества идет трансформация ретикулоэпителиальных клеток в тельца Гассалья, что совершенно не характерно для нормального тимуса. Они выявляются диффузно, находясь на разных стадиях формирования. С тимическими тельцами тесно контактируют своими отростками дендритные клетки (S-100<sup>+</sup>), одновременно сообщаясь и с тимоцитами. Большая часть S-100 положительно окрашенных клеток диффузно присут-

ствуют в пределах всего коркового вещества, формируя множественные контакты с тимоцитами и сосудами. Имеются они также и в субкапсулярной зоне, где залегают поодиночке или группой по 2-3 клетки, окружаясь тимоцитами. В течение года количество дендритных клеток в коре увеличивается до  $9,9 \pm 3,2$  ( $p=0,001$ ) в поле зрения, в контроле –  $2,6 \pm 0,8$ .

Тимоциты, в течение всего периода наблюдений теряют компактность своего расположения. В местах деструкции эпителиальной стромы связь с эпителиоретикулоцитами нарушена, верифицируются клетки в состоянии апоптоза. В таких участках часто формируются зоны опустошения. К 11 месяцу численность корковых тимоцитов в поле зрения в сравнении с контролем снижается на 21% ( $p=0,001$ ).

Структурные изменения в тимусе сопровождаются устойчивостью тимоцитов к апоптозу. Признаком служила активность генов *bcl-2* в корковых тимоцитах. *Bcl-2*-позитивные клетки чаще выявляются диффузно, нередко формируя скопления. К 6 мес. в корковом веществе от мозгового формируются крупные скопления *bcl-2* позитивных тимоцитов. В результате в кортикальной части дольки в участках нахождения дубль-позитивных тимоцитов ( $CD4^+CD8^+$ ) экспрессия *bcl-2* уже через 1 месяц вырастает в 2 раза, а к 6–11 месяцам – в 2,5 раза ( $p=0,05$ ) по отношению к контролю.

Таким образом, в тимусах при ВПС синего типа развивается комплекс значительных морфологических перестроек. Особое внимание на себя обращает изменение в состоянии эпителиальной стромы. В корковом веществе идет формирование тимических телец и кроме

того во всех его зонах имеются признаки дистрофического изменения эпителиоретикулоцитов. Можно предположить, что изменение в состоянии эпителиальной стромы и вызвало усиление развития дендритных клеток ( $S-100^+$ ). Известно, что в норме основное место пребывания дендритных клеток – мозговое вещество, где они активно участвуют в проведении отрицательной селекции тимоцитов [3]. Под влиянием дендритных клеток ( $S-100^+$ ) тимические тельца, в свою очередь, вырабатывают TSLP (стромальный лимфопоэтин тимуса), способствуя появлению апоптозоустойчивых лимфоцитов [2]. На протяжении всего возрастного периода в цитоплазме корковых тимоцитов наблюдали стойкое увеличение антиапоптотического белка *Bcl-2*. В норме тимоциты этой зоны практически лишены *Bcl-2* белка, что и делает их уязвимыми на этапах селекции.

Изменение в состоянии ретикулоэпителиальной стромы серьезно может повлиять на этапы развития корковых тимоцитов, что отразится на качестве формирования адаптивного иммунитета у данной категории больных детей.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дударев И. В. Иммунология, 2002, т. 23, № 3, 167-170.
2. Ярилин А. А. ГЭОТАР-Медиа. 2010, 747.
3. Anderson G., Baik S., Cowan J. E. et al. *Microbiology and Immunology*. 2014 (373); 19-47.
4. Hale L. P. *Annals of Diagnostic Pathology*. 2004; 8 (1): 50-60.
5. Shah D. K., Zuniga-Pflucker J. C. *Immunology*, 2014, 192: 4017-4023.

### STRUCTURAL FEATURES OF THYMUS IN THE EARLY PERIOD OF POSTNATAL ONTOGENESIS IN CHILDREN WITH CONGENITAL HEART DISEASE

Loginova N. P., Chetvertnykh V. A., Khromtsova G. A.

*Academician E. A. Wagner Perm State Medical University, Perm, Russia*

Results of investigation of the thymic tissue in children with CHD are presented. During the 1-year of life (1 month, 6 months, 11 months) the immunomorphological complex rearrangements develop in the body. A change in the state of epithelial stroma led to the formation of Hassall corpuscles in the cortex. Dendritic cells ( $S-100^+$ ) were in close contact with them and were revealed diffusely within the crust. Throughout the age period in the cytoplasm of cortical thymocytes a steady increase in the antiapoptotic protein *Bcl-2* was observed. Thus, the change in the state of reticuloepithelial stroma can render effect on the stages of development of cortical thymocytes that affect the quality of the formation of adaptive immunity in this population of children.

## ОСОБЕННОСТИ ИНДУКЦИИ FasL И LIGHT-ЗАВИСИМОГО АПОПТОЗА У ЖЕНЩИН С УГРОЗОЙ ПРЕРЫВАНИЯ БЕРЕМЕННОСТИ В ПЕРВОМ ТРИМЕСТРЕ И ПРИВЫЧНЫМ НЕВЫНАШИВАНИЕМ

Малышкина А. И., Батрак Н. В., Крошкина Н. В.

ФГБУ «Ивановский НИИ материнства и детства им. В. Н. Городкова»  
Минздрава России, Иваново, Россия

Развитие угрозы прерывания беременности на ранних сроках у женщин с привычным невынашиванием сопровождается угнетением апоптоз индуцирующей способности лимфоцитов и моноцитов, опосредованной FasL молекулами, которое коррелирует со степенью выраженности клинических симптомов невынашивания и наличием маркеров бактериального и вирусного инфицирования.

**Ключевые слова:** невынашивание беременности, периферическая кровь, регуляция апоптоза.

Невынашивание является в настоящее время одним из наиболее частых осложнений гестационного процесса, которое диагностируется у 10–25% беременных женщин [1]. Исследования последних лет доказали важную роль иммунных нарушений в досрочном прерывании беременности [2]. Принято считать, что в случаях неадекватной реакции материнской иммунной системы на семиаллогенный плод происходит чрезмерная активация Th1 типа реакций, направленных на отторжение плода [2]. Известно, что активность клеток иммунной системы, как и любых других клеток организма, регулируется балансом между уровнем пролиферативных процессов и программированной клеточной гибелью – апоптозом [3]. В настоящее время выявлено большое количество молекул, участвующих в регуляции апоптоза, при этом показана важная роль в этом процессе факторов из семейства TNF, таких например, как FasL, LIGHT молекул и их рецепторов [3]. Ранее было показано, что молекула FasL напрямую участвует в защите клеток плодовой части плаценты от атаки со стороны материнской иммунной системы [4], но особенности включения FasL-зависимого пути апоптоза на системном уровне при беременности, осложненной угрозой прерывания и привычным невынашиванием, изучены недостаточно. Литературные данные о характере системной продукции LIGHT в ранние сроки

беременности также немногочисленны и неоднозначны. В связи с этим, целью нашего исследования было выявить особенности включения апоптоза по FasL и LIGHT-зависимому пути на системном уровне при угрозе прерывания беременности на ранних сроках для уточнения иммунных механизмов регуляции апоптоза при беременности.

Нами было проведено обследование 50 женщин с угрозой прерывания беременности в первом триместре и привычным невынашиванием (основная группа). Контрольную группу составили 30 беременных женщин без признаков угрозы прерывания беременности и привычного невынашивания в сроке гестации 5-12 недель. Материалом для исследования служила периферическая венозная кровь. Проводили определение уровня FasL (CD178)-позитивных лимфоцитов и моноцитов с помощью моноклональных антител методом проточной цитофлюориметрии на приборе «FACScanto II» («Becton Dickinson», USA). Содержание LIGHT, DcR3 в сыворотке крови определяли методом ИФА с использованием коммерческих тест-систем производства («RayBio», USA). Кроме того, оценивали наличие иммуноглобулинов классов IgM, IgA, IgG к возбудителям вирусной (ВПГ, ЦМВ, ВЭБ) и бактериальной (*Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia pneumoniae* и *Mycoplasma pneumoniae*) инфекции методом

ИФА с использованием коммерческих систем ЗАО «Вектор-Бест» (Новосибирск, Россия).

Анализ полученных результатов показал, что сывороточное содержание индуцирующего апоптоз фактора LIGHT и его «рецептор-ловушки» DcR3 не различалось у пациенток основной и контрольной групп. В то же время индивидуальный анализ данных показал, что высокие значения LIGHT чаще встречались у женщин из контрольной группы (17,2%), чем у пациенток основной группы (6,2%). Та же закономерность отмечалась нами в отношении сывороточного уровня DcR3. Высокие положительные значения сывороточного уровня DcR3 были выявлены нами у 41,4% женщин контрольной группы и у 16,9% пациенток основной группы. При этом выявленные различия были статистически значимыми ( $p=0,018$ ). Следует отметить, что высокое сывороточное содержание DcR3 было ассоциировано с развитием плацентарной недостаточности во второй половине беременности у пациенток, как основной, так и контрольной групп. Таким образом, складывается впечатление, что при развитии угрозы невынашивания LIGHT-зависимый путь индукции апоптоза не играет существенной роли, при этом усиление активности факторов, ингибирующих этот путь апоптоза, ассоциировано с развитием плацентарной недостаточности.

Нами также было установлено, что у пациенток с угрозой прерывания беременности на ранних сроках и привычным невынашиванием в периферической крови было снижено относительное содержание CD178<sup>+</sup> лимфоцитов и моноцитов. В максимальной степени это снижение проявлялось у женщин с начавшимся выкидышем. Уровень CD178-позитивных моноцитов также был изначально снижен у женщин с развившейся впоследствии плацентарной недостаточностью и угрожающим поздним выкидышем по сравнению с пациентками без этих осложнений гестационного периода. Нами был проведен анализ показателей содержания CD178<sup>+</sup> лимфоцитов и моноцитов у пациенток основной группы в зависимости от наличия у них маркеров бактериального и вирусного инфицирования. Было установлено, что наличие в крови пациенток основной группы IgG антител к *Chlamydia trachomatis* и *Mycoplasma hominis* ассоциировалось со значительным угнетением апоптоз индуцирующей функции моно-

цитов, а IgM антител к *Chlamydia trachomatis* и вирусу Эпштейна-Барр – с угнетением апоптоз индуцирующей функции лимфоцитов. Мы также выявили взаимосвязь между высоким сывороточным уровнем DcR3 и наличием маркеров острого бактериального инфицирования и IgG антител к *Mycoplasma hominis* у пациенток основной группы.

Таким образом, полученные результаты позволяют говорить об ингибировании включения апоптоза на системном уровне по FasL-зависимому пути у пациенток с угрозой невынашивания. В максимальной степени угнетение апоптоз индуцирующей способности лимфоцитов и моноцитов отмечалось у женщин с признаками начавшегося выкидыша, плацентарной недостаточности и при наличии маркеров острого вирусного и хронического бактериального инфицирования. Выявленная нами взаимосвязь между угнетением FasL-зависимого пути апоптоза, реализуемого лимфоцитами и моноцитами крови, с выраженностью клинических симптомов невынашивания позволяет говорить о том, что нарушение регуляции апоптоза на системном уровне может отражать изменения апоптоза на локальном уровне, а именно: непосредственно в плаценте. Известно, что баланс про- и анти-апоптотических процессов играет важную роль при формировании тканей плаценты в ранние сроки беременности [5].

Вероятно, сниженная экспрессия FasL молекул на поверхности циркулирующих лимфоцитов и моноцитов может вести к формированию пула плацентарных лимфоцитов и макрофагов, не способных к адекватной индукции апоптоза. Выявленное нами значительное угнетение апоптоз-индуцирующей способности лимфоцитов и моноцитов и повышение сывороточного уровня DcR3 у пациенток с угрозой невынашивания, имеющих признаки бактериального и вирусного инфицирования, свидетельствует о нарушении процессов своевременной элиминации инфицированных клеток у пациенток с угрозой невынашивания.

По-видимому, реализация повреждающего воздействия инфекционного фактора при угрозе невынашивания происходит в результате максимально выраженного угнетения апоптоза по FasL-зависимому пути и за счет повышения активности реакций, обусловленных «рецептором-ловушкой» DcR3.



## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Сидельникова В. М., Сухих Г. Т. Невынашивание беременности. Москва: МИА 2010; 536.
2. Аполихина И. А., Шнейдерман М. Г., Тетерина Т. А., Горбунова Е. А. Гинекология. 2013, 15 (5), 60-65.
3. Соколов Д. И. Медицинская иммунология. 2008; 2-3, 125-138.
4. Сельков С. А., Соколов Д. И. Журнал акушерства и женских болезней. 2010, 1, 6-10.
5. Шестопапов А. В., Микашинович З. И., Буштырева И. О., с соавт. Журнал акушерства и женских болезней. 2009, 2, 72-80.

**THE CHARACTER OF FASL AND LIGHT-DEPENDENT APOPTOSIS INDUCTION IN WOMEN WITH THREATENED ABORTION IN THE FIRST TRIMESTER AND RECURRENT MISCARRIAGE**

**Malyshkina A. I., Batrak N. V., Kroshkina N. V.**

*V. N. Gorodkov Federal State Research Institute of Maternity and Childhood, Ivanovo, Russia*

Development of the threatened abortion in the first trimester of pregnancy in women with recurrent miscarriage is accompanied by the suppression of the FasL-dependent apoptosis-inducing capacity of peripheral blood lymphocytes and monocytes which is correlated with the degree of clinical symptoms and the presence of the markers of bacterial and viral infection.

**ЦИТОКИНОВЫЙ СТАТУС У ЖЕНЩИН ФЕРТИЛЬНОГО ВОЗРАСТА В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ФАЗ МЕНСТРУАЛЬНОГО ЦИКЛА**

**Арипова Т. У.<sup>1</sup>, Музафарова С. А.<sup>2</sup>, Хайдарова Ф. А.<sup>2</sup>**

*<sup>1</sup>Институт иммунологии АН РУз; <sup>2</sup>Республиканский научно-практический медицинский центр эндокринологии, Ташкент, Узбекистан*

Проведено исследование по изучению уровня провоспалительных и противовоспалительных цитокинов в динамике менструального цикла. Было выявлено, что в фолликулиновую фазу уровень IL-4 и IL-6 достоверно выше, чем в лютеиновую. Однако уровень провоспалительных цитокинов в лютеиновую фазу достоверно выше, чем в фолликулиновую. Таким образом, у практически здоровых женщин репродуктивного возраста уровень цитокинового статуса меняется в зависимости от фаз МЦ, т.е. в зависимости от гормонального фона.

*Ключевые слова:* иммунитет, менструальный цикл, цитокины.

Отражением работы репродуктивной системы является нормальный менструальный цикл (МЦ), который в среднем длится 28 дней. Основной функцией МЦ является развитие фолликула, в котором созревает яйцеклетка. Созревание яйцеклетки – очень сложный процесс, в котором принимает участие нейроиммуноэндокринная система. На каждом этапе МЦ происходит изменение синтеза определенных гормонов при активном участии параметров иммунной системы [1, 2, 3, 4].

Целью исследования являлось изучение уровня провоспалительных и противовоспалительных цитокинов у женщин репродуктивного возраста в динамике МЦ.

**Материалы и методы исследования.** Проведено исследование по изучению уровня провоспалительных (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ ) и противовоспалительных (IL-4) цитокинов у 28 практически здоровых женщин репродуктивного возраста в зависимости от фаз МЦ. Концентрацию цитокинов определяли методом

ИФА. Для постановки реакций использовали тест систему ООО «Цитокин», (Россия). Исследование проводилось в сыворотке периферической крови, которую брали на 3–5-й день МЦ (фолликулиновая фаза) и на 21-й день (лютеиновая фаза). Математическую обработку данных проводили методами вариационной статистики с помощью стандартных математических пакетов прикладных программ с определением средней, ее ошибки, критерия *t*-Стьюдента.

**Результаты и их обсуждение.** Как известно, цитокины вовлекаются в регуляцию секреции половых гормонов, модуляцию овуляторного процесса и функционирования желтого тела. TNF $\alpha$ , IL-1 и IL-6 оказывают плейотропный эффект на функцию яичников. Уровень и количественное соотношение цитокинов меняется в зависимости от фазы фолликулогенеза.

У практически здоровых женщин уровень IL-1 $\beta$  в фолликулиновую фазу был сниженным в 1,5 раза по сравнению с уровнем в лютеиновую фазу ( $22,4 \pm 1,9$  пкг/мл против  $34,6 \pm 1,76$  пкг/мл,  $P < 0,05$ ). Анализ результатов по изучению уровня IL-6 показал повышенный синтез его в фолликулиновую фазу в 1,8 раза ( $32,9 \pm 1,96$  пкг/мл против  $18,6 \pm 1,6$  пкг/мл,  $P < 0,01$ ).

У практически здоровых женщин репродуктивного возраста в фолликулиновую фазу уровень IL-4 достоверно выше ( $26,7 \pm 1,67$  пкг/мл), чем в лютеиновую фазу ( $17,8 \pm 1,4$  пкг/мл) ( $P < 0,01$ ). Молекулы IL-8 участвуют в процессах овуляции, менструации, оплодотворения и имплантации эмбриона [3,4]. В сыворотке периферической крови в фолликулиновую фазу МЦ уровень IL-8 в 1,4 раза ниже ( $16,8 \pm 1,5$  пкг/мл), чем в лютеиновую фазу ( $22,8 \pm 1,7$  пкг/мл) ( $P < 0,01$ ).

Уровень TNF $\alpha$  в лютеиновую фазу достоверно выше, чем в фолликулиновую ( $32,9 \pm 2,1$  пкг/мл против  $25,7 \pm 2,5$  пкг/мл,  $P < 0,01$ ). По данным ряда авторов, транскрипты TNF $\alpha$  были идентифицированы в эндометрии в течение МЦ. Количество мРНК TNF $\alpha$  увеличивалось в течение пролиферативной фазы, уменьшалось в ранней секреторной фазе и снова поднималось в период между средней и поздней секреторными фазами [3]. Динамика уровня TNF $\alpha$  позволяет предполагать позитивную связь с уровнем всех женских половых гормонов, которые имеют сходные циклические колебания [3,4].

Анализ результатов исследования по изучению уровня IFN $\gamma$  в сыворотке периферической крови у женщин репродуктивного возраста по фазам МЦ показал, что концентрация его в фолликулиновую фазу в 1,5 раза ниже ( $18,7 \pm 2,1$  пкг/мл), чем в лютеиновую ( $28,4 \pm 2,0$  пкг/мл), ( $P < 0,05$ ).

Таким образом, проведенные исследования показали, что нормальные параметры овуляторного менструального цикла связаны с изменениями показателей иммунного гомеостаза. Циклический характер изменений в иммунной системе практически здоровых женщин репродуктивного возраста соответствует представлению о менструальном цикле как месячном биоритме функционирования органов и систем организма, и обусловлены циклическостью функционирования системы гипоталамус – гипофиз – яичники. Формирующийся на пике овуляции сдвиг баланса регуляторных факторов в сторону цитокинов / медиаторов с иммуносупрессорной / противовоспалительной активностью определяет эффект последующей имплантации эмбриона и во многом способствует успешному развитию беременности. Изучение уровня цитокинов в сыворотке крови у практически здоровых женщин показало, что в фолликулиновую фазу уровень IL-4 и IL-6 повышен, в этот период наблюдается пик синтеза ФСГ. Нужно отметить, что сниженная секреция данных цитокинов сопровождается наступлением атрезии фолликула. Лютеиновая фаза характеризуется повышенным уровнем ЛГ, которая сопровождается повышением IL-1 $\beta$ , IL-8, IFN $\gamma$  и TNF $\alpha$  с включением процесса апоптоза.

Процесс овуляции сопряжен с разрывом здоровой ткани на поверхности яичника, и происходит в присутствии каскада воспалительных медиаторов, включающих провоспалительные цитокины. С этой точки зрения разрыв овуляторного фолликула в лютеиновую фазу напоминает воспалительную реакцию, которая может инициироваться и опосредоваться с участием лейкоцитов [2]. Установлено, что под влиянием лютеинизирующего гормона происходит аккумуляция IL-1 $\beta$  в клетках Лейдига [2,3]. Таким образом, у практически здоровых женщин репродуктивного возраста уровень цитокинового статуса меняется в зависимости от фаз МЦ, т.е. в зависимости от гормонального фона.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Долгушина В. Ф., Телешева Л. Ф., Ремесленникова И. В. и др. Тез. докл. науч. конф. – Челябинск, 1997. – С. 40-41
2. Кетлинский С. А., Симбирцев А. С. Цитокины. С. – Пб. «Фолиант», 2008, 560 с.
3. Ширшев С. В. Механизмы иммунного контроля процессов репродукции. – Екатеринбург, 1999. – 381 с.
4. Ярилин А. А. Основы иммунологии. – М. Медицина. – 1999. – 608 с.

## CYTOKINE BALANCE DEPENDING ON THE PHASE OF MENSTRUAL CYCLE IN FEMALE FERTILE AGE

Aripova T. U.<sup>1</sup>, Muzafarova S. A.<sup>2</sup>, Khaydarova F. A.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institute of Immunology of Science of Academy Republic of Uzbekistan;

<sup>2</sup>RSPMC of endocrinology, Tashkent, Uzbekistan

We studied the levels of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in menstrual cycle (MC) dynamics. The levels of IL-4 and IL-6 were found to be lower in the follicular phase than those in the luteal one, while the levels of anti-inflammatory cytokines are confidently higher in the luteal phase. Thus, in healthy women of reproductive age the cytokine status changes through MC phases, that is depending on the hormonal profile.

*Key words:* immunity, menstrual cycle, cytokines.

## РОЛЬ ГУМОРАЛЬНЫХ ФАКТОРОВ В РАЗВИТИИ ПЕРВИЧНОЙ СЛАБОСТИ РОДОВОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ У ПЕРВОРОДЯЩИХ ЖЕНЩИН

Нестеров В. Ф., Ремизова И. И.

ФГБУ «НИИ ОММ» Минздрава России, Екатеринбург, Россия

С целью оценки компонентов гуморального иммунитета при первичной слабости родовой деятельности проведено исследование 23 пациенток, роды у которых осложнились первичной слабостью родовой деятельности, и 41 пациентки с физиологическим родами. В сроке доношенной беременности за 3-4 дня до предполагаемой даты родов проводилось исследование содержания сывороточных цитокинов IL-4, INF- $\gamma$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , С3, С4 и циркулирующих иммунных комплексов. Установлено повышение уровня TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$  и увеличение концентрации С3 компонента комплемента, высокомолекулярных циркулирующих иммунных комплексов в сыворотке крови у женщин с первичной слабостью родовой деятельности, что указывает на провоспалительную направленность иммунологических реакций.

*Ключевые слова:* первичная слабость родовой деятельности, цитокины.

**Актуальность и цель работы.** По данным зарубежных авторов, нарушения родовой деятельности (РД) встречаются у 15% рожениц, а по данным отечественных авторов – у 11-17% рожениц [1]. Первичная слабость родовой деятельности (СРД) является основным видом нарушений процесса родов, так как на ее долю приходится более 60% от всех

аномалий. Несмотря на большое количество работ, вопрос об этиологии, патогенезе, лечении, профилактике и прогнозировании СРД остается нерешенным. В последнее время внимание исследователей привлекло изучение иммунологических аспектов течения родового акта. Известно, что в основе спонтанного развития родовой деятельности

лежат механизмы регуляции, важное место среди которых занимает система цитокинов, а также ростовых и эндотелиальных факторов [2]. Доказано, что некоторые цитокины, например, фактор некроза опухоли-альфа (TNF- $\alpha$ ), интерлейкин 1 (ИЛ-1), не только активируют синтез простагландинов в матке, плаценте и плодных оболочках, но и повышают чувствительность окситоциновых рецепторов [3]. Однако в то же время очень мало данных об участии сывороточных цитокинов в развитии аномалий родовой деятельности, что и явилось целью настоящего исследования: роль компонентов гуморального иммунитета и цитокинов сыворотки крови в развитии первичной слабости родовой деятельности у первородящих женщин.

**Материалы и методы.** Проведено проспективное когортное исследование 64 соматически здоровых первобеременных женщин. По исходу родов пациентки были разделены на две группы: 1-я основная группа – 23 пациентки, роды у которых осложнились первичной слабостью родовой деятельности, 2-я группа (сравнения) – 41 пациентка с физиологическим родами. В сроке доношенной беременности за 3-4 дня до предполагаемой даты родов, проводилось исследование содержания сывороточных цитокинов и циркулирующих иммунных комплексов. Уровень сывороточных цитокинов IL-4, INF- $\gamma$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , C3, C4 компонентов комплемента оценивали методом иммуноферментного анализа в соответствии с рекомендациями фирм производителей («Вектор-Бест», Россия). Детекцию проводили на иммуноферментном фотометре «Multiskan MCC/340» фирмы Labsystems (Финляндия). Концентрацию циркулирующих иммунных комплексов разной молекулярной массы оценивали по методу V. J. Naskova et al. (1978), в модификации Ю. А. Гриневич (1981) [4]. Полученные количественные данные представляли в виде медианы (*Me*) и нижнего, и верхнего квартилей ( $P_{25}$ – $P_{75}$ ). Проверку статистических гипотез об отсутствии межгрупповых различий осуществляли с помощью непараметрического *U*-критерия Манна-Уитни. Критический уровень значимости различий *p*, при котором нулевая гипотеза об отсутствии различий отвергалась и принималась альтернативная, принимали равным 0,05.

**Результаты.** Возраст беременных, включенных в исследование, колебался от 18 до 33 лет

и составил в среднем  $24,83 \pm 4,16$  лет в основной и  $23,61 \pm 4,65$  лет в группе сравнения. По соматическому и акушерскому анамнезу группы также были сопоставимы. Беременность всех обследованных женщин протекала без осложнений. Наличие воспалительных процессов внутренних органов, явилось критерием исключения для проведения данного исследования. С целью исключения воспалительного процесса в матке проводился бактериологический посев из цервикального канала и исследование соскобов цервикального канала методом ПЦР на урогенитальные инфекции. Накануне родов у всех исследуемых женщин при проведении шеечного теста шейка матки оценена, как «недостаточно зрелая» – 3–4 балла. В группе женщин с физиологическими родами преобладало спонтанное развитие родовой деятельности (62,5%), а в основной группе этот показатель составил лишь 32,4%. В основной группе накануне родов содержание высокомолекулярных циркулирующих иммунных комплексов было достоверно ниже 22 (14–27) у.е., против 35 (29–41) у.е. в группе сравнения ( $p > 0,05$ ). При оценке уровня низкомолекулярных ЦИК, статистически значимых различий не выявлено, содержание их в основной группе составило 12 (9–15) у.е., в группе сравнения 19 (24–15) у.е. ( $p > 0,05$ ), однако суммарное содержание ЦИК также было сниженным в основной группе пациенток 34 (23–42) у.е. против 54 (41–65) у.е. соответственно по группам ( $p > 0,05$ ). Циркуляция в кровеносном русле ЦИК опосредована активацией системы комплемента, в частности образованием анафилотоксинов C3 и C4, а также привлечением других клеток иммунной системы. Содержание C3- системы комплемента в основной группе составило 111,20 (99,56–132,3) мг/дл, тогда как в группе сравнения этот показатель был несколько выше: 170,55 (139,5–191,4) мг/дл ( $p > 0,05$ ). Наиболее информативными оказались уровни провоспалительных сывороточных цитокинов TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ . Содержание TNF- $\alpha$  в группе пациенток с первичной слабостью родовой деятельности в 3 раза превышало показатели группы сравнения: 4,19 (1,1–5,732) пг/мл, против 0,765 (0–2,19) пг/мл соответственно ( $p > 0,05$ ). Концентрация INF- $\gamma$  в этой группе женщин также была достоверно высокой: 7,99 (0,426–17,3) пг/мл против 1,425 (0–11,4) пг/мл в группе сравнения ( $p > 0,05$ ). При оценке содержания сывороточных IL-4

и IL-6 обеих групп, статистически значимых различий не выявлено.

Таким образом, при развитии первичной слабости родовой деятельности у женщин отмечается повышение уровня высокомолекулярных ЦИК, C3 – компонента комплемента и содержания TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$  в сыворотке крови. Увеличение содержания ЦИК в сыворотке крови указывает на вероятность их накопления в тканях и развития местного воспалительного процесса в местах их отложения, с последующей активацией синтеза эндогенных простагландинов, а повышенная элиминация цитокинов в кровяное русло накануне родов, может явиться крайне неблагоприят-

ным фактором риска формирования первичной слабости родовой деятельности.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дмитриева С.Л., Хлыбова С.В. Сборник науч. трудов «Актуальные вопросы акушерства и гинекологии», Киров 2009, 5, 24-27.
2. Некрасова М.Г., Волошина А.В., Друккер Н.А., Погорелова Т.Н. Российский вестник акушера-гинеколога 2009, 9 (6), 10-13.
3. Некрасова М.Г., Орлов А.В., Друккер Н.А., Михайлова А.С., Волошина А.В. Материалы III регионального научного форума «Мать и дитя», Саратов 2009. 192-193.
4. Гриневиц Ю.А. Алферов А.Н. Лабораторное дело 1981, 8, 493.

### THE ROLE OF HUMORAL FACTORS IN THE DEVELOPMENT OF THE PRIMARY WEAKNESS OF LABOR IN NULLIPAROUS WOMEN

Nesterov V. F., Remizova I. I.

*Mother and Child Care Ural Research Institution of Russia Public Health Ministry,  
Yekaterinburg, Russia*

In order to evaluate the components of humoral immunity in the primary weakness of labor there were investigated 23 patients, whose delivery was complicated by primary weakness of labor, and 41 patients with normal birth. At term pregnancy, 3-4 days before the expected date of delivery, the research of serum cytokines IL-4, INF- $\gamma$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , C3, C4, and circulating immune complexes was carried out. Elevated levels of TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$  and increase in the concentration of complement component C3, macromolecular circulating immune complexes were determined in the serum of women with primary weakness of labor that indicates the proinflammatory orientation of immune responses.

---

### РЕЗИСТЕНТНОСТЬ ШТАММОВ *P. AERUGINOSA*, ВЫДЕЛЕННЫХ У ПАЦИЕНТОК АКУШЕРСКОГО СТАЦИОНАРА С ИНФЕКЦИЕЙ МОЧЕВЫХ ПУТЕЙ

Омарова С. М., Моллаева А. М., Алиева А. И.,  
Исаева Р. И., Акаева Ф. С.

*ГБОУ ВПО Дагестанская государственная медицинская академия,  
Махачкала, Россия*

К возбудителям различных клинических форм внутрибольничного инфицирования пациентов лечебных учреждений принято относить микроорганизмы, которые приспособились к постоянному обитанию в условиях стационара. Наиболее часто возбудителями внутрибольничных инфекций (ВБИ) являются бактерии, структура и свойства которых варьируют в пределах определенного стационара и зависят от популяции пациентов, локализации инфекции, практики применения антибиотиков и методов контроля.

*Ключевые слова:* акушерский стационар, инфекции мочевых путей.

В последние годы одно из лидирующих положений в нозологической структуре ВБИ занимают инфекции мочевыводящих путей (ИМП), достигая 40% и являясь проблемой для врачей различных специальностей, в том числе и для акушеров-гинекологов. Среди возбудителей ИМП в акушерских стационарах лидируют грамотрицательные бактерии и, в частности, *Pseudomonas aeruginosa* (от 0,7 до 1,4%), причем существенно возросла роль полирезистентных штаммов синегнойной палочки. В значительной степени это является следствием бесконтрольного и широкого профилактического применения антибактериальных препаратов, нерационального назначения эмпирической терапии внутрибольничной инфекции с ростом резистентных штаммов, а также изменения биологии самого возбудителя [1, 2, 3, 4, 5].

Целью настоящего исследования являлось изучение закономерностей развития эпидемического процесса внутрибольничных ИМП, вызванных *P. aeruginosa* для минимизации риска инфицирования пациенток. Для достижения поставленной цели необходимо было оценить распространенность инфекций мочевыводящих путей у пациентов акушерского стационара, выявить факторы развития внутрибольничных ИМП, установить пути передачи инфекций, причиной которых является *P. aeruginosa*, а также выявить различия в активности антисинегнойных препаратов в отношении изолированных госпитальных штаммов.

В исследование были включены штаммы *P. aeruginosa*, выделенные из клинических образцов мочи от 45 пациенток. Выделено и изучено 11 штаммов. Забор и посев исследуемого материала проводили согласно приказу МЗ СССР от 22.04.85 № 535 «Об унификации микробиологических методов исследования, применяемых в клиничко-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений». Идентификацию и определение чувствительности к антибиотикам проводили с использованием дифференциально-диагностических питательных сред и среды АГВ, а также микротест-систем (производство НПО «Питательные среды» г. Махачкала). Определение чувствительности *P. aeruginosa* к антибиотикам (амикацину, цефтазидиму, цефепиму, имипенему, меропенему, пиперациллину и азитромицину) проводили диско-диффузионным методом согласно МУК 4.2.1890-04.

Микробиологическое исследование мочи от родильниц с внутрибольничными осложнениями мочевыводящих путей производили в динамике. Уровень обсемененности клинического материала, равный  $10^5$  и выше колониеобразующих единиц (КОЕ) /г содержимого, считался критическим.

Наиболее частыми возбудителями госпитальных инфекций мочевыводящих путей в обследованном акушерском стационаре, по нашим данным, являлись энтеробактерии, которые выделялись в 34,6% случаев.

В 22 случаях инфекция имела полимикробную этиологию. Частота микст-инфекций составила 13,5%. *P. aeruginosa* была выделена из мочи в 11 (13,5%) случаях.

Важное практическое значение для клинки имеет мониторинг антибиотикочувствительности выделенных культур *P. aeruginosa*, который необходим для создания регионального реестра препаратов, рекомендуемых для проведения этиотропной терапии. Результаты определения чувствительности госпитальных штаммов *P. aeruginosa* к антибиотикам с антисинегнойной активностью, выявили наименьшую активность пиперациллина и азитромицина (64,2%-68,7% резистентных штаммов, соответственно). К цефтазидиму устойчивость составила 14,3% шт., к цефепиму – 11,6% шт. К имипенему были устойчивы 9,6% штаммов, меропенему – 5,1%, амикацину – 11,7% и цiproфлоксацину – 26,3% штаммов. Характерно, что отмечался высокий уровень резистентности *P. aeruginosa* к гентамицину: более 47% штаммов.

Результаты исследований показали, что *P. aeruginosa* часто была причиной инфекционных осложнений при микробиологическом исследовании образцов мочи, полученных с применением катетеров, особенно многократного использования. Из 18 изученных проб мочи выделено 4 штамма (22%), которые в дальнейшем были идентифицированы как *P. aeruginosa* с типичными свойствами возбудителя. Наибольшую активность в отношении протестированных штаммов *P. aeruginosa* (4 шт.) проявляли цефтазидим (чувствительность – 71,9% шт.), цефепим (чувствительность – 83,2% шт.), меропенем и имипенем (чувствительность – 91% шт. и 87,1% шт. соответственно). К препаратам с низкой активностью в отношении изолированных штаммов следует отнести пипера-

циллин и азитромицин (чувствительность – 23,6% и 27,8% соответственно).

Таким образом, резистентность грамотрицательных возбудителей ИМП (*P. aeruginosa*), выделенных из образцов мочи пациенток в акушерском стационаре, остается серьезной проблемой. Рост количества неферментирующих бактерий в структуре возбудителей ИМП в обследованном стационаре значительно осложняет проведение эффективной антибактериальной терапии в связи с высокой резистентностью псевдомонад к большинству антибиотиков. Результаты исследований позволят корректировать политику применения антимикробных препаратов в стационаре на основании индивидуальных результатов определения чувствительности изолятов к препаратам.

Полученные данные подтверждают необходимость проведения регулярного мониторинга за причинно-следственными факторами распространения инфекций мочевых путей

среди пациенток акушерского стационара. Ослабленная неспецифическая резистентность организма женщин, как правило, усугубляет патогенез и клиническую картину внутрибольничных осложнений микробной этиологии. С целью сдерживания селекции резистентности у бактерий, вызывающих внутрибольничные инфекции, возможно, использовать ротацию антибиотиков.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Животнева И. В. Медицинская сестра, 2012, № 7, С. 24-29.
2. Жукова Э. В. Заместитель главного врача: лечебная работа и медицинская экспертиза, 2012, № 10, С. 22-30.
3. Покровский В. И. Здоровоохранение, 2011, № 1, С. 14-20.
4. Шеховцова О. В., Шаталова Е. В. Клиническая лабораторная диагностика, 2012, № 7, С. 58-61.
5. Юрченко С. А. Медицинская сестра, 2012, № 4, С. 54-59.

#### RESISTANT STRAINS OF *P. AERUGINOSA* ISOLATED FROM HOSPITAL OBSTETRIC PATIENTS WITH URINARY TRACT INFECTION

Omarova S. M., Mollaeva A. M., Alieva A. I.,  
Isaeva R. I., Akaeva F. S.

*Dagestan State Medical Academy, Makhachkala, Russia*

As the agents of different clinical forms of nosocomial infection in hospital patients are accepted those microorganisms that have been adapted to a permanent dwelling in the hospital. The most common cause of hospital-acquired infections (HAI) are bacteria, structure and properties of which vary within a certain hospital, depending on the patient population, the localization of the infection, the use of antibiotics and control methods.

*Key words:* urinary tract infection, antibiotic resistance of pathogens.

## ДИНАМИКА ИЗМЕНЕНИЙ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ОДНОСПИРАЛЬНЫХ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ В ТКАНЕВЫХ БАЗОФИЛАХ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ВО ВТОРОЙ ПОЛОВИНЕ БЕРЕМЕННОСТИ

Параскун А. А., Виноградов С. Ю., Штойко М. А.

*ГБОУ ВПО ИвГМА Минздрава России, Иваново, Россия*

С помощью микроспектральных флуоресцентно-гистохимических методов установлено, что во второй половине беременности у крыс содержание односпиральных нуклеиновых кислот в тканевых базофилах щитовидной железы увеличивается на 10 сутки и снижается на 15-19 сутки эксперимента. Эти изменения происходят синхронно с динамикой параметров морфофункциональной активности железы.

*Ключевые слова:* односпиральные нуклеиновые кислоты, тканевые базофилы, щитовидная железа, беременность.

Известно, что женщины чаще, чем мужчины, страдают от тиреоидных нарушений. В последние годы распространенность этих заболеваний у женщин во время беременности увеличивается, что проявляется в повышении частоты преждевременных родов, уменьшении массы тела новорожденных, задержке их развития и др. [5]. Щитовидная железа (ЩЖ) играет важную роль в регуляции процессов жизнедеятельности организма. Она контролируется двумя тесно взаимосвязанными системами: гипоталамо-гипофизарной и нервнопроводниковой. В поддержании внутриорганного гомеостаза щитовидной железы принимают участие тканевые базофилы (ТБ) [4], которые накапливают и выделяют широкий спектр биологически активных веществ (гистамин, гепарин, серотонин, катехоламины, цитокины, липидные медиаторы и др.), тем самым, регулируя пролиферацию клеток, их дифференцировку, функциональную активность, межклеточные взаимодействия, как в норме, так и в условиях воспаления, регенерации и при развитии иммунных реакций [1, 2, 3].

**Цель исследований** – оценка динамики содержания односпиральных нуклеиновых кислот в тканевых базофилах щитовидной железы во второй половине беременности у крыс.

Работа выполнена на 40 здоровых беспородных крысах – самках зрелого репродуктивного возраста. Сроки эксперимента составили 10, 15, 16, 19 сутки беременности. В качестве контроля использовали самок, находящихся

на стадии эструса. Исследования с животными проводили в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приказ № 724 Минвуза от 13.11.1984 г.). Флуоресцентно-микроспектральный анализ односпиральных нуклеиновых кислот (ОНК) проводили по R. Rigler в модификации В. Н. Карнаухова (1984). Парафиновые срезы ЩЖ окрашивали акридиновым оранжевым и исследовали с помощью микроскопа ЛЮМАМ – ИЗ, стандартного набора светофильтров и зонда 0,5. Фотометрическая установка ФМЭЛ-1А позволяет дифференцировать флуоресценцию нуклеиновых кислот, а также по замерам интенсивности свечения, регистрируемой в условных единицах, судить об их количественном содержании в изучаемых клетках. Для оценки плотности пространственного распределения ТБ срезы обрабатывали альциановым синим-сафранином в прописи J. Desaga. 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 интерпрограммы «Microsoft Excel 2010».

Тканевые базофилы (ТБ) чаще всего располагаются около кровеносных сосудов, нередко тесно примыкают к базальной мембране фол-



ликулов и перифолликулярных капилляров. В них наблюдается флуоресценция односпиральных нуклеиновых кислот (ОНК) в красной части спектра (640 нм). На начальном этапе исследований (10 сутки) количество тканевых базофилов минимально, а содержание в них ОНК максимально, с преобладанием флуоресценции ТБ центральной зоны щитовидной железы. Уровень тироксина в сыворотке крови животных (на 10 сутки) достоверно выше, чем в последующие сроки эксперимента. Затем (на 15 сутки) плотность пространственного распределения ТБ увеличивается, а содержание в них ОНК уменьшается. Позднее (16, 19 сутки) наблюдается дальнейшее снижение концентрации ОНК в ТБ и их количественного распределения. Зональные (центр-периферия) различия изучаемых показателей (ОНК) выявлены на 10 сутки беременности, а на 15, 16, 19 сутки происходит их сглаживание.

Таким образом, увеличение флуоресценции ОНК в тканевых базофилах на 10 сутки эксперимента может свидетельствовать об интенсивности экспрессии генов и усилении транскрипции, следствием которой является активация синтетических процессов в ТБ и их участия в регуляции морфо-функционального состояния щитовидной железы.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гордон Д. С., Сергеева В. Е., Зеленова Н. Г. Л.: Наука, 1982. 128с.
2. Диндяев С. В. Успехи современного естествознания, 2007, № 10, С.26-29.
3. Кондашевская М. В. Вестник РАМН, 2010, № 6, С.49-54.
4. Штойко М. А., Виноградов С. Ю., Параскун А. А., Сизов М. И. Российский иммунологический журнал, 2013, Т. 7, № 2-3, С.338.
5. Su P. Y., Huang K., Hao J. H. et al. J. Clin. Endocrinol. Metab. 2011. Aug 10.

### DYNAMICS OF CHANGES IN THE CONTENT OF SINGLE-NUCLEIC ACIDS IN TISSUE BASOPHILS OF THE THYROID GLAND IN THE SECOND HALF OF PREGNANCY

Paraskun A. A., Vinogradov S. Yu., Shtoyko M. A.

*Ivanovo State Medical Academy of the Ministry of Health of the Russian Federation, Ivanovo, Russia*

With microspectral fluorescent histochemical methods it was found that in the second half of pregnancy in rats the content of single-nucleic acids in tissue basophils of the thyroid gland increased by 10 day, but reduced by 15-19 days of the experiment. These changes occur simultaneously with the dynamics of the parameters of morphofunctional activity of the thyroid gland.

### ГИСТОНОВЫЕ БЕЛКИ ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ ПРИ УГРОЗЕ ПРЕРЫВАНИЯ БЕРЕМЕННОСТИ

Пестряева Л. А.<sup>1</sup>, Шипицына Е. А.<sup>1</sup>, Гетте И. Ф.<sup>2</sup>, Данилова И. Г.<sup>2</sup>,  
Борисова С. В.<sup>1</sup>, Кинжалова С. В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБУ «Уральский НИИ охраны материнства и младенчества», Минздрова России;

<sup>2</sup>ФГБУН Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, Екатеринбург, Россия

При определении гистоновых белков в лимфоцитах крови женщин с физиологическим течением беременности по сравнению с показателями небеременных женщин выявлено существенное увеличение (почти в 2 раза) общего количества гистоновых белков преимущественно за счет H<sub>2</sub>A, H<sub>3</sub>, H<sub>4</sub> и H<sub>2</sub>B-фракций, что может быть связано с уменьшением активности лимфоцитов и развитием толерантности к тканям плода. При угрозе прерывания, в отличие от нормально протекающей беременности, прирост фракции H<sub>2</sub>A, H<sub>3</sub>, H<sub>4</sub> менее выражен.

*Ключевые слова:* гистоновые белки, лимфоциты, невынашивание беременности.

**Актуальность** работы определяется высокой частотой встречаемости патологии невынашивания беременности, которая по данным разных авторов составляет от 15% до 25% от общего числа беременностей [1]. По мнению ряда авторов, причиной нарушения развития беременности и формирования эмбриона в большинстве случаев следует считать дисбаланс в эпигенетической регуляции деятельности иммунокомпетентных клеток [3, 4]. Предположение о нарушении эпигенетической регуляции посредством изменения количества гистоновых белков с последующим приобретением лимфоцитами стойкого провоспалительного фенотипа требует дальнейшего исследования.

**Целью работы** было исследование гистоновых белков в лимфоцитах периферической крови женщин при физиологическом и осложненном течении беременности (угроза прерывания, регрессирующая беременность).

**Материалы и методы.** Были обследованы 3 группы пациенток (всего 85 человек): 1 – контрольная группа – здоровые небеременные женщины ( $n=20$ ), 2 – физиологическое течение беременности в I триместре ( $n=30$ ), 3 – угроза прерывания беременности, регрессирующая беременность ( $n=35$ ). Критерием исключения пациенток из исследования явилась тяжелая соматическая патология. Лимфоциты выделяли из крови в смеси фиколл-верографин. Определение содержания гистоновых белков проводили методом Л.И. Маркушевой и соавт., 2000 [2]. Статистический анализ полученных данных выполнен с помощью электронных таблиц Microsoft Office Excel и пакета прикладных программ «Statistica for Windows 7.0».

**Результаты и обсуждение.** Результаты проведенного исследования показывают, что у здоровых небеременных женщин (1 группа) в лимфоцитах периферической крови преобладают гистоновые белки, относящиеся к  $H_1$ -фракции (лизинсодержащие гистоны) –  $55,63 \pm 2,68\%$ . На долю  $H_2A, H_3, H_4$ -фракции (аргининбогатые белки) приходится  $37,35 \pm 3,07\%$  и  $7,01 \pm 1,00\%$  –  $H_2B$  – гистоны. Отношение  $H_1$  фракции к  $H_2A, H_3, H_4$  фракции составляет 1,49.

При физиологическом развитии беременности (2 группа) уже к 7 неделе гестации наблюдается достоверное ( $p < 0,001$ ) изменение абсолютного и относительного содержания гистоновых белков. Абсолютное содержание

гистонов увеличивается в 1,7 раза, наибольший прирост (более чем в 2 раза) отмечается для  $H_2A, H_3, H_4$ - и  $H_2B$ -фракций,  $H_1$ -фракция увеличилась на 14,3%. Относительное содержание белков  $H_1$ -фракции снижается практически в 1,5 раза и составляет  $38,18 \pm 2,37\%$ ;  $H_2A, H_3, H_4$  повышается в 1,4 раза (до  $52,78 \pm 2,05\%$ ). Отношение фракции  $H_1$  к  $H_2A, H_3, H_4$  составляет 0,72. Содержание фракции  $H_2B$  при этом достоверно не изменяется и составляет  $9,04 \pm 1,60\%$ .

При неблагоприятном развитии беременности (3 группа), в отличие от физиологического, не наблюдается увеличения всех исследованных фракций, и это увеличение менее выражено (всего в 1,2 раза). Изменение спектра гистоновых белков в 3 группе (по сравнению с небеременными) заключается в снижении  $H_1$ -фракции (до  $39,40 \pm 1,79\%$ ,  $p < 0,001$  по отношению к контролю), однако содержание фракции  $H_2A, H_3, H_4$ - гистонов составляет  $42,67 \pm 2,72\%$ , оставаясь практически на уровне показателя небеременных женщин, и достоверно отличается от аналогичных показателей у женщин 2 группы ( $p < 0,01$ ). Наиболее значительно в 3 группе достоверное ( $p < 0,001$ ) повышение  $H_2B$ -фракции по отношению как к контролю, так и ко 2 группе (до  $17,92 \pm 1,93\%$ , прирост в 2,5 раза по сравнению с контролем).

Таким образом, проведенные исследования выявили существенное увеличение (почти в 2 раза) общего количества гистоновых белков преимущественно за счет  $H_2A, H_3, H_4$ - и  $H_2B$ -фракций в лимфоцитах крови при физиологическом развитии беременности по сравнению с показателями небеременных женщин. При угрозе прерывания беременности, в отличие от нормально протекающей беременности, менее выражен прирост фракции  $H_2A, H_3, H_4$ , но увеличена фракция  $H_2B$ . Известно, что от содержания гистоновых белков  $H_2A, H_3, H_4$  в лимфоцитах крови зависит выделение лимфоцитами провоспалительных цитокинов [5]. Накопление гистонов этих фракций в лимфоцитах крови при физиологическом течении беременности, вероятно, можно расценивать как «молчание» соответствующих генов, что необходимо для уменьшения активности лимфоцитов и развития толерантности к тканям плода.

Полученные данные могут быть использованы в разработке новых лабораторных способов прогноза риска невынашивания беременности.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Макаров О. В., Козлов П. В., Николаев Н. Н. и др. Российский мед. журнал, 2007. № 2. С. 3-6
2. Маркушева Л. И., Савина М. И., Решина В. М., Тогузов Р. Т. Клиническая лабораторная диагностика. 2000. № 7. С. 18-20.
3. Bi Y., Lv Z., Wang Y. et al. Biol. Reprod. 2011. 84 (4). P. 756-64.
4. Hoek A., Schoemaker J., Drexhage H. A. Endocrine Reviews. 1997. V. 18, No. 1. P. 107-135.
5. Villeneuve L. M., Reddy M. A., Lanting L. L. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2008. 105 (26). P. 9047-52.

### HISTONE PROTEINS OF BLOOD LYMPHOCYTES WITH THE THREATENED MISCARRIAGE

Pestryaeva L. A.<sup>1</sup>, Shipytzyna E. A.<sup>1</sup>, Gette I. F.<sup>2</sup>, Danilova I. G.<sup>2</sup>, Borisova S. V.<sup>1</sup>, Kinzalova S. V.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ural Scientific Research Institute of Maternity and Infancy; <sup>2</sup>Institute of Immunology and Physiology UB RAS, Yekaterinburg, Russia

Determination of blood lymphocyte histone proteins from women with physiological pregnancy is comparison to non-pregnant ones showed a significant increase (almost by 2 times) of the histone protein total amount mainly due to H<sub>2</sub>A, H<sub>3</sub>, H<sub>4</sub> and H<sub>2</sub>B fractions, that may be associated with a decrease in lymphocyte activity and the development of tolerance to fetus tissues. The threatened miscarriage, unlike normal pregnancy, is characterized by lower growth H<sub>2</sub>A, H<sub>3</sub>, H<sub>4</sub>- fraction.

### НЕКОТОРЫЕ ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ОСЛОЖНЕНИЙ БЕРЕМЕННОСТИ И РОДОВ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ПИЕЛОНЕФРИТЕ

Петров С. В.<sup>1</sup>, Хардигов А. В.<sup>2</sup>, Михайлов И. В.<sup>3</sup>, Снимщикова И. А.<sup>3</sup>, Халилов М. А.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Медицинский центр ООО «Авиценна», Курск; <sup>2</sup>ГБОУ ВПО Курский государственный медицинский университет, Курск; <sup>3</sup>ФГБОУ ВПО «Орловский государственный университет», Орел, Россия

Проведенный анализ течения беременности и родов у 300 пациенток с неосложненным хроническим пиелонефритом показывает, что хронический воспалительный процесс протекает по типу персистирующего без тенденции к завершению варианта системной воспалительной реакции, ведущим звеном в котором является дисфункция иммунной системы. Пациентки с хроническим пиелонефритом нуждаются в проведении прегравидарной подготовки с целью коррекции имеющихся нарушений, что позволит уменьшить частоту и степень выраженности осложнений при беременности во время родов и послеродовом периоде.

*Ключевые слова:* беременность и роды, хронический пиелонефрит, магнитное поле, гестационный пиелонефрит, иммунитет беременных.

**Введение.** Хронические воспалительные заболевания мочевыводящих путей выявляются у 12–15% женщин репродуктивного возраста. В структуре экстрагенитальной патологии у беременных хронический пиелонефрит (ХП) по праву занимает ведущее место (48–54%). Пиелонефрит оказывает неблагоприятное влияние на течение беременности и состояние плода, проявляющееся в значительном увеличении частоты угрозы

прерывания беременности, преждевременных родов, плацентарной недостаточности, гипоксии плода, его внутриутробного инфицирования, преэклампсии и осложненного течения периода адаптации у новорожденного. Однако механизм трансформации воспалительного процесса в осложнения беременности изучен недостаточно.

**Целью** явилось выявление патогенетических механизмов реализации осложнений беременности у пациенток с неосложненными вариантами ХП.

**Материалы и методы.** Проведен анализ течения беременности и родов у 300 пациенток с неосложненным ХП (основная группа) и у 50 соматически здоровых женщин (контрольная группа). Выраженность перекисного окисления липидов (ПОЛ) оценивали по содержанию малонового диальдегида (МДА), ацетилгидроперекисей (АГП), активности каталазы и супероксиддисмутазы (СОД) в сыворотке крови. Фенотип лимфоцитов определяли методом иммуноферментного анализа с помощью моноклональных антител (производство ТОО «Сорбент» (г. Москва) к мембранным кластерам дифференцировки CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup>, CD95<sup>+</sup>. Изучение концентраций ФНО-α, ИЛ-1β, ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-10 и ИФН-γ в сыворотке крови проводили методом твердофазного иммуноферментного анализа. Оценка показателей гемостаза, ПОЛ и системы иммунитета осуществлялась во время ремиссии ХП за 1-6 месяцев до наступления запланированной беременности и на 26-28 неделях беременности.

Гистоморфологический метод был использован для изучения характера и степени выраженности морфологических изменений в плаценте и пуповине после родов.

Анализ результатов показал, что частота обострения ХП во время беременности составила 37,0%. Лейкоцитурия выявлялась у 71,0% беременных с ХП и у 7,0% пациенток контрольной группы. Бессимптомная бактериурия регистрировалась у 42,0% пациенток основной группы и не выявлялась в контрольной группе. При исследовании системы гемостаза у пациенток с ХП установлено, что даже вне беременности имеются признаки гиперкоагуляции. Выявлено увеличение показателя тромбопластиновой активности: 74,3±0,5%, по сравнению с 57,2±0,6% в контрольной группе (p<0,05). У беременных

с ХП данный показатель составил 85,5±0,3%. Величина протромбинового индекса существенно не различались у пациенток с ХП и в контрольной группе, как до беременности (97,6±0,6% и 96,4±0,8), так и во время гестации (p≥0,5). При этом время рекальцификации плазмы было достоверно снижено у пациенток с ХП. Толерантность плазмы к гепарину (ТПГ) в группе пациенток с ХП вне беременности и во время беременности была существенно выше, чем в группе контроля. При беременности выявлено нарастание концентрации фибриногена у пациенток с ХП, а также фибринстабилизирующего фактора.

Кроме того, у пациенток с ХП вне беременности установлено уменьшение количества CD4<sup>+</sup>, увеличение CD8<sup>+</sup> и CD16<sup>+</sup> клеток по сравнению с группой контроля. Во время беременности у пациенток с ХП наблюдалось достоверное увеличение числа CD4<sup>+</sup> и CD95<sup>+</sup> лимфоцитов на фоне незначительного снижения количества CD8<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup>. При оценке цитокинового статуса у беременных женщин с ХП установлено повышение уровня ИФН-γ, ФНО-α, ИЛ-4 и незначительное снижение концентраций ИЛ-1β и ИЛ-6. Концентрация ИЛ-2 до беременности у пациенток с ХП составила 65,57±5,08 пг/мл, что было ниже, чем у пациенток контрольной группы – 86,25±5,37 пг/мл (p≤0,05). При этом у пациенток с ХП отмечено увеличение уровня ИЛ-10 до 95,67±3,27 пг/мл, по сравнению с данными до беременности (p≤0,05).

Кроме того, у пациенток с ХП до и во время беременности, по сравнению с женщинами контрольной группы, регистрировалось повышение концентраций МДА, АГП, активности каталазы.

Самопроизвольное прерывание беременности до 22 недель произошло у 6,7% пациенток с ХП и у 2,0% пациенток контрольной группы. Значительно чаще беременность при ХП осложнялась преэклампсией (17,8%), по сравнению с контрольной группой (4,0%). В 32,5% случаев у пациенток с пиелонефритом беременность сопровождалась хронической фетоплацентарной недостаточностью, маловодием (в 10,7%), многоводием (в 19,2% наблюдений). Беременность протекала с явлениями угрозы прерывания у 15,0% пациенток с ХП и только у 8,0% пациенток контрольной группы. Преждевременная частичная отслой-

ка плаценты наблюдалась у 3,2% пациенток с ХП и не регистрировалась у пациенток контрольной группы. Клинические признаки внутриутробного инфицирования присутствовали у 19,2% новорожденных в группе пациенток с ХП и только у 4,0% новорожденных из контрольной группы. Заболеваемость новорожденных в основной группе составила 56,4%, в группе контроля – 12,2%.

У пациенток с ХП только в 21,8% случаев была установлена нормальная гистологическая структура плаценты, в контрольной группе – в 65,0% случаев.

Таким образом, выявленный дисбаланс продукции цитокинов, изменение числа иммунорегуляторных лимфоцитов, гемостаза, процессов перекисного окисления липидов у женщин основной группы, по сравнению с группой контроля, могут оказывать выраженное негативное влияние на течение бе-

ременности, нарушая процессы имплантации и функционирования фетоплацентарного комплекса, что подтверждается высокой частотой осложнений беременности и результатами гистологического исследования плаценты. Пациентки с ХП нуждаются в проведении прегравидарной подготовки с целью коррекции хронического персистирующего воспалительного процесса, что позволит уменьшить частоту и степень выраженности осложнений при беременности, во время родов и послеродовом периоде.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Серов В. Н. Тютюнник В. Л. Русский медицинский журнал 2008, 16 (1), 10-13.
2. Greer L. G. Infect. Dis. Obstet. Gynecol.– 2008, 89 (14), 26.
3. Suman E., Gopalkrishna Bhat K., Hegde B. M. Int. J. Gynaecol. Obstet. 2001, 75 (3), 263-268.

### SOME PATHOGENETIC ASPECTS OF COMPLICATIONS IN PREGNANCY AND CHILDBIRTH IN CHRONIC PYELONEPHRITIS

<sup>1</sup>Petrov S.V., <sup>2</sup>Khardikov A.V., <sup>3</sup>Mikhailov I.V.,  
<sup>3</sup>Snimschikova I.A., <sup>3</sup>Khalilov M.A.

<sup>1</sup>Medical Center PLC "Avitsenna", Kursk; <sup>2</sup>SBEI HPE Kursk State Medical University, Kursk;  
<sup>3</sup>FSBEI HPE "Orel State University", Orel, Russia

The conducted analysis of the course of pregnancy and childbirth in 300 patients with the uncomplicated chronic pyelonephritis shows that a chronic inflammatory process is going as persistent without a tendency to complete the systemic inflammatory reaction, where the key element is the dysfunction of the immune system. Patients with chronic pyelonephritis need the pregravid preparation with the purpose of correcting of existing violations that will allow decreasing the frequency and degree of the intensity of complications in pregnancy during the childbirth and in the postpartum period.

*Key words:* pregnancy and childbirth, chronic pyelonephritis, magnetic field, gestational pyelonephritis, pregnant's immunity.

## К ВОПРОСУ О МЕХАНИЗМАХ СОЗРЕВАНИЯ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ Т-ЛИМФОЦИТОВ

Полевщиков А. В.<sup>1,2</sup>, Кудрявцев И. В.<sup>1,2</sup>, Старская И. С.<sup>2</sup>,  
Васильев К. А.<sup>1,2</sup>, Серебрякова М. К.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ФГАОУ ВПО "Дальневосточный федеральный университет",  
Владивосток; <sup>2</sup>ФГБНУ "Институт экспериментальной медицины",  
Санкт-Петербург, Россия

Работа посвящена изучению уровня апоптоза и уровня экспрессии ключевых маркеров тимоцитов в тимусе интактных животных, а также оценке влияния иммунизации на уровень экспрессии генов *rag-1* и *tdt*. Результаты исследования методом проточной цитометрии свидетельствуют о низком уровне апоптоза в тимусе интактных мышей. В результате иммуногистохимического анализа установлено, что уровень апоптоза в медуллярной зоне значительно выше, чем в кортикальной части тимуса. Впервые получены экспериментальные доказательства изменения уровня экспрессии генов *rag1* и *tdt* в клетках тимуса в результате внутрибрюшинной иммунизации мышей фетальной бычьей сывороткой.

*Ключевые слова:* тимус, популяции тимоцитов, апоптоз.

Главный нерешенный вопрос иммунофизиологии по-прежнему связан с парадоксами процесса созревания и дифференцировки Т-лимфоцитов [1, 4]. Особенно много вопросов вызывают постулируемые процессы позитивной и негативной селекции созревающих Т-лимфоцитов. Наиболее аргументированная современная гипотеза указывает на кортикальную локализацию незрелых Т-лимфоцитов, находящихся на разных этапах созревания, протекающие в связи с клетками-няньками селекционные процессы, приводящие к гибели подавляющего большинства тимоцитов, и роль мозгового вещества как транзитного отдела, содержащего зрелые SP Т-лимфоциты. Даже постулируемый очень высокий уровень апоптоза DP-лимфоцитов не является доказанным [3].

**Целью** данной работы был анализ уровня апоптоза и пролиферации всех популяций тимоцитов, динамики их маркеров и влияния иммунизации на экспрессию генов *rag-1* и *tdt*, управляющих реаранжировкой Т-клеточного рецептора (TCR).

**Материалы и методы.** В работе использовали белых нелинейных мышей и мышей линии СВА массой тела 18-20 г в возрасте 6-10 недель. Для оценки уровня апоптоза были использованы конъюгированные с флуорохромами пан-

специфические ингибиторы каспаз FAM FLICA Poly Caspase Assay Kit ("Immunochemistry", США), результат выражали в виде процента FLICA<sup>+</sup> клеток. Уровень пролиферирующих клеток в тимусе определяли с использованием антител к ядерному белку PCNA ("BioLegend", США), а результат представляли в виде процента PCNA<sup>+</sup> клеток. Для выявления основных популяций тимоцитов использовали моноклональные антитела против CD4, CD8, CD45 мыши, конъюгированные с PE/Cy5, PE/Cy7, APC/Cy7 соответственно ("BioLegend"). Все исследования проводили в соответствии с протоколами изготовителей. Образцы анализировали с помощью проточного цитометра Navios ("Beckman Coulter", США).

Парафиновые срезы тимуса готовили по стандартной методике. Для определения локализации апоптотических клеток в тимусе проводили иммуногистохимическое окрашивание срезов антителами к каспазе-3 ("Abcam", США), срезы подкрашивали водным раствором астрового синего и после заключения фотографировали на микроскопе Leica DM6000 (Германия).

Оценку экспрессии генов *rag-1* и *tdt* проводили по стандартной методике методом полимеразной цепной реакции в реальном времени.

**Результаты и обсуждение.** Выявлен низкий уровень апоптоза в незрелых CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> клетках наряду со значительным количеством пролиферирующих клеток. Результаты проточной цитометрии и данные иммуногистохимии указывают на высокий уровень апоптоза именно в медуллярной зоне тимуса, где локализуются зрелые цитотоксические (CD8<sup>+</sup>) и хелперные (CD4<sup>+</sup>) Т-лимфоциты, что принципиально расходится с доминирующей гипотезой об элиминации 95–99% CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> клеток в ходе селекционных процессов. Между тем, именно очень высокий уровень апоптоза в этой популяции является одним из главных оснований современной теории дифференцировки Т-лимфоцитов, предусматривающей стохастический характер формирования TCR и наличие процессов позитивной и негативной селекции в ходе дальнейшего созревания Т-клеток.

Показано, что уровень апоптоза CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> тимоцитов в тимусе взрослой интактной мыши не превышает 5%, что свидетельствует против существующей гипотезы созревания и дифференцировки Т-клеток. Доля клеток в апоптозе в медуллярной части тимуса значительно выше, чем в кортексе, что косвенно указывает на протекание селекционных процессов в медуллярной зоне тимуса, содержащей зрелые CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> и CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> тимоциты.

Также установлено наличие на поверхности всех созревающих тимоцитов (начиная со стадии DN2) важнейшего корецептора CD28, с проведением сигнала от которого связывают экспрессию IL-2, α-цепи его рецептора (CD25 антигена) и запуск пролиферации Т-клеток в ходе иммунного ответа. Более того, среди незрелых DP-timoцитов свыше 98% клеток несут CD28. От 0,5 до 4% DP экспрессируют мембранную или внутриклеточную форму антигена CD152 (CTLA-4), с которым связывают торможение клональной экспансии в ходе иммунного ответа, что ставит под сомнение статус тимуса как центрального органа иммунного надзора, не вовлеченного в иммунный ответ.

В ходе работы показана способность тимоцитов отвечать на введение антигена повышением экспрессии генов *rag-1* и *tdt*, осуществляющих реаранжировку генов TCR, в 2-2,5 раза. Установлено также, что предварительная стимуляция фагоцитов мышей внутрибрюшинным введением полимерного декстрана за 72 ч до иммунизации приводит к ускорению ответа тимоцитов на антигенную стимуляцию.

Полученные результаты позволяют предполагать совершенно иной характер созревания Т-клеток. Не исключено, что сигналом, определяющим запуск экспрессии генов *rag* и *tdt*, является взаимодействие молекулы SCF (stem cell factor) со стороны клетки-няньки, и CD117 (c-kit) со стороны созревающего тимоицита на стадиях DN1-2. Это приводит к появлению на мембране тимоицита β-цепи TCR, а также антигена CD3. Ассоциация β-цепи TCR с предшественником α-цепи (pTα) позволяет на стадии DN4 провести проверку работоспособности комплекса β-TCR и CD3, что, возможно, и является позитивной селекцией. При этом характер презентруемого пептида может не играть критической роли. Успешное прохождение позитивной селекции обеспечивает переход клетки в состояние DP, которые начинают экспрессировать CD28 ещё до завершения формирования α-цепи TCR. Полученные результаты указывают на то, что её реаранжировка может носить в тимусе антиген-зависимый характер. В этом случае этап негативной селекции в отношении абстрактного антигена теряет смысл, сменяясь селекцией в отношении конкретного ксеноантигена при одновременной дихотомии DP-лимфоцитов на CD4<sup>+</sup> или CD8<sup>+</sup> SP-Т-клетки. Одновременно получает своё объяснение и очень низкий уровень апоптоза DP-лимфоцитов, которые без презентации ауто- или ксеноантигена не претерпевают реаранжировки α-цепи TCR [2]. Одновременно нельзя исключить, что и формирование клона антиген-специфических Т-клеток происходит не в периферических лимфоидных органах, а в мозговом веществе тимической доли, решая, тем самым, вопрос об отсутствии Т-клеточной пролиферации в периферических лимфоидных органах. Однако данное предположение требует дополнительной экспериментальной проверки.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы № 1326 и гранта 14-08-06-25\_и Дальневосточного федерального университета и гранта РФФИ № 15-04-05093а.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Васильев К. А., Полевщиков А. В. // Онтогенез. – 2015. – Т. 46, № 3. – С. 1–12.
2. Старская И. С., Полевщиков А. В. Морфологические аспекты атрофии тимуса при стрессе // Иммунология. – 2013. – Т. 34, № 5. – С. 271–277.

3. Старская И. С., Кудрявцев И. В., Гусельникова В. В. и др. Уровень апоптоза Т-лимфоцитов, созревающих в интактном тимусе // Доклады Академии Наук. – 2015. – Т. 462, № 2. – С. 1–3.
4. Старская И. С., Гурова О. В., Засеева М. Д. и др. // Цитокины и воспаление. – 2014. – Т. 13, № 4. – С. 29–33.

## TO THE QUESTION OF T-LYMPHOCYTE MATURATION AND DIFFERENTIATION MECHANISMS

Polevshchikov A. V.<sup>1,2</sup>, Kudryavtsev I. V.<sup>1,2</sup>, Staskaya I. S.<sup>2</sup>,  
Vasilev K. A.<sup>1,2</sup>, Serebryakova M. K.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Far Eastern Federal University, Vladivostok;

<sup>2</sup>Institute of Experimental Medicine, St. - Petersburg, Russia

The aim of this study is to assess the level of cell death and expression of key markers in the murine thymus as well as the influence of immunization on *rag-1* and *tdt* level. Flow cytometry assay indicates a low number of apoptotic cells in the thymus. These findings are inconsistent with the theory which states that more than 95% of immature CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> thymocytes die during their maturation. Immunohistochemical assay shows that the number of apoptotic cells was higher in the medulla than in the cortex. These results cast doubts on the stochastic model of T cell development and positive and negative selection processes in the thymus during T cell maturation.

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ В ПРОГНОЗИРОВАНИИ БРОНХОЛЕГОЧНОЙ ДИСПЛАЗИИ У ДЕТЕЙ С ЭКСТРЕМАЛЬНО НИЗКОЙ МАССОЙ ТЕЛА

Ремизова И. И., Чистякова Г. Н., Газиева И. А.

ФГБУ «НИИ ОММ» Минздрава России, Екатеринбург, Россия

Проведено исследование уровня цитокинов и белков острой фазы пуповинной крови у детей с экстремально низкой массой тела, с развившейся впоследствии бронхолегочной дисплазией (БЛД). Установлено, что показатели пуповинной крови новорожденных с БЛД характеризуются повышением уровня IFN- $\gamma$  и С-реактивного белка, снижением концентрации IL-4 и церулоплазмينا, что позволяет использовать вышеназванные показатели в качестве дополнительных критериев при прогнозировании бронхолегочной дисплазии у детей с экстремально низкой массой тела.

*Ключевые слова:* экстремально низкая масса тела, бронхолегочная дисплазия.

Формирование бронхолегочной дисплазии (БЛД) у детей с экстремально низкой массой тела (ЭНМТ) связывают с нарушением развития легких вследствие действия большого количества пренатальных (внутриутробное воспаление) и постнатальных (искусственная оксигенация, баротравма) факторов на фоне незавершенности процессов альвеоло- и ангиогенеза. Кроме того, незрелость системы антиоксидантной защиты недоношенного ребенка сопровождается риском повреждения тканей активными формами кислорода и развитием воспалительного процесса, что стимулирует

выброс в циркуляцию провоспалительных цитокинов и острофазных белков. Подтверждением этого являются высокие концентрации провоспалительных цитокинов (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, TNF- $\alpha$ ) в бронхоальвеолярном лаваже и сыворотке крови, определяемые в первые сутки жизни детей, с развившейся впоследствии БЛД [1, 2, 3, 4]. Вместе с тем, несмотря на большое количество исследований, вопрос, посвященный прогнозированию данной патологии у недоношенных детей, остается открытым.

**Цель исследования:** оценить уровень цитокинов и белков острой фазы в пуповинной



крови новорожденных с экстремально низкой массой тела, с развившейся впоследствии бронхолегочной дисплазией.

**Материал и методы.** Проведено иммунологическое обследование 46 новорожденных с экстремально низкой массой тела, подразделенных на две группы в зависимости от реализации БЛД: 1-я группа – 24 ребенка, развивших впоследствии БЛД, 2-я группа – 22 ребенка без БЛД.

Уровни IFN- $\gamma$ , IL-4 и лактоферрина в сыворотке пуповинной крови определяли методом ИФА с помощью реагентов ЗАО «Вектор-Бест» (Россия), концентрацию С-реактивного белка (СРБ) – с использованием тест-систем фирмы «Biomerica» (США), содержание гаптоглобина и церулоплазмينا – методом турбидиметрии с помощью наборов фирмы «Sentinel» (Италия), уровень неоптерина – с использованием наборов фирмы «IBL» (Германия).

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета прикладных программ «Statistica for Windows 6.0». В случае распределения признаков, соответствующих закону нормального распределения, данные представляли в виде среднего значения и стандартного отклонения, в противном случае – медианы (Me), нижнего (P25) и верхнего (P75) квартилей. Проверку статистических гипотез об отсутствии межгрупповых различий осуществляли с помощью непараметрического U-критерия Манна-Уитни (уровень значимости различий принимали  $p < 0,05$ ).

**Результаты и обсуждение.** Гестационный возраст обследуемых детей с ЭНМТ составил  $30,04 \pm 5,2$  недели (1-я группа) и  $30,81 \pm 6,63$  недели (2-я группа) ( $p > 0,05$ ). Масса тела новорожденных, с реализованной впоследствии БЛД была достоверно ниже –  $847,5 (750-922,5)$  г против  $880,5 (767,5-915)$  г во 2-й группе,  $p = 0,03$ . Средняя оценка по шкале Апгар на 1-й и 5-й минутах жизни также была значительно ниже у новорожденных 1-й группы ( $3,2 \pm 1,5$  и  $5,3 \pm 0,64$  баллов против  $4,1 \pm 1,28$  и  $5,7 \pm 0,07$  баллов во 2-й группе,  $p = 0,0001$  и  $p = 0,01$ ). Средняя продолжительность нахождения в отделении реанимации и интенсивной терапии новорожденных у детей 1-й группы составила  $35,9 \pm 6,3$  дней, 2-й группы –  $11,7 \pm 3,4$  дней ( $p < 0,001$ ). Пребывание на искусственной вентиляции легких составило  $20,3 \pm 5,8$  дней для детей 1-й группы и  $4,1 \pm 2,7$  дней для новорожденных 2-й группы, продолжительность дальнейшей респираторной

поддержки методом ВНСРАР –  $9,9 \pm 2,8$  дней и  $4,2 \pm 2,3$  дней соответственно ( $p = 0,001$ ).

Проведенные исследования показали, что концентрация провоспалительного IFN- $\gamma$  у детей 1-й группы практически в 2 раза превышала аналогичный показатель новорожденных 2-й группы ( $11,75 (11,25-12,5)$  пг/мл против  $5,5 (4,13-9,59)$  пг/мл,  $p = 0,0001$ ). При этом уровень регуляторного IL-4 был достоверно ниже и составлял  $0,6 (0,39-2,14)$  пг/мл против  $2,37 (1,97-2,9)$  пг/мл во 2-й группе,  $p = 0,012$ ), что свидетельствует о смещении цитокинового баланса, определяемого соотношением провоспалительных и регуляторных цитокинов (IFN- $\gamma$ /IL-4) у новорожденных с БЛД в сторону клеточно-опосредованного иммунного ответа. Статистически значимых различий в значении данного показателя не выявлено вследствие большой вариабельности показателей ( $18,9 (5,83-32,69)$  против  $2,74 (1,12-4,35)$  у детей 2-й группы).

Воспалительная направленность иммунных реакций у детей, реализовавших БЛД, подтверждалась повышенным уровнем С-реактивного белка ( $0,35 (0,25-1,15)$  мг/л против  $0,25 (0,20-0,25)$  мг/л,  $p = 0,001$ ), а сниженное содержание церулоплазмينا ( $10,21 (4,05-15,0)$  мг/дл против  $13,35 (9,13-20,0)$  мг/л  $p = 0,028$ ) указывало на дефицит факторов антиоксидантной защиты.

Другим показателем, отражающим активность клеточного иммунитета, является неоптерин, способствующий повышению клеточной цитотоксичности. При исследовании уровня неоптерина обнаружено его увеличение у новорожденных, с развившейся впоследствии БЛД ( $28,91 (25,62-30,03)$  нмоль/л против  $23,86 (18,14-28,68)$  нмоль/л детей 2-й группы,  $p = 0,04$ ), что свидетельствует о повышенной функциональной активности моноцитарно-макрофагального звена иммунитета у новорожденных 1-й группы.

**Заключение.** В результате проведенных исследований установлено, что показатели пуповинной крови новорожденных, с развившейся впоследствии БЛД характеризуются воспалительной направленностью клеточных реакций, которая проявляется повышением уровня IFN- $\gamma$  и С-реактивного белка, сопряженным со снижением концентрации IL-4 и церулоплазмينا, что позволяет использовать вышеуказанные маркеры в качестве дополнительных критериев при прогнозировании бронхолегочной дисплазии у детей с экстремально низкой массой тела.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ambalavanan N., Carlo W.A., D'Angio C.T. et al. *Pediatrics* 2009; 123 (4): 1132-41.
2. Speer C.P. *Journal of Perinatology* 2006; 26: 57-62.
3. Bose C., Laughon M., Allred E.N. et al. *Pediatric Research* 2011; 69 (4): 347-53.
4. Carvalho C.G., Silveira R.C., Prociano R.S. *Rev. Bras. Ter. Intensiva*. 2013; 25 (4): 319-26.

**USING OF THE IMMUNOLOGICAL PARAMETERS  
IN PREDICTING THE BRONCHOPULMONARY DYSPLASIA  
IN CHILDREN WITH EXTREMELY LOW BIRTH WEIGHT**

**Remizova I. I., Chistyakova G. N., Gazieva I. A.**

*Mother and Child Care Ural Research Institution of Russia Public Health Ministry,  
Ekaterinburg, Russia*

Determination of cytokines and acute phase proteins in cord blood of children with extremely low birth weight, which later developed bronchopulmonary dysplasia (BPD) was carried out. It was found out that the parameters of umbilical cord blood of infants with BPD were characterized by the increased levels of IFN- $\gamma$  and C-reactive protein, a decrease in the concentration of IL-4 and ceruloplasmin, which allows using of the above parameters as the additional criteria in predicting of bronchopulmonary dysplasia in infants with extremely low birth weight.

*Keywords:* extremely low birth weight, bronchopulmonary dysplasia.

**ВОЗДЕЙСТВИЕ КОМПОНЕНТОВ СЕМЕННОЙ ЖИДКОСТИ,  
ХАРАКТЕРИЗУЮЩЕЙСЯ ЛЕЙКОЦИТОСПЕРМИЕЙ, НА  
ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ НЕЙТРОФИЛОВ,  
ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ**

**Савельева А. А., Долгушин И. И., Савочкина А. Ю., Орнер И. Ю.**

*ФГБОУ ВПО Южно-Уральский государственный медицинский университет,  
Челябинск, Россия*

Известно негативное влияние лейкоцитов в отношении сперматозоидов. Однако и сама семенная жидкость оказывает воздействие на компоненты женского репродуктивного тракта, в частности на иммунокомпетентные клетки. Среди таких клеток нейтрофилы наиболее представительны. В данной работе показано влияние клеточных элементов эякулята и супернатанта, полученных из семенной жидкости, характеризующейся лейкоцитоспермией, на функциональную активность нейтрофилов, выделенных из периферической крови. Функциональный статус нейтрофилов оценивался по лизосомальной и фагоцитарной активности, а также оценке внутриклеточного кислородзависимого метаболизма.

*Ключевые слова:* семенная жидкость, лейкоциты, нейтрофилы, фагоцитоз.

**Актуальность и цель работы.** Известно, что присутствие лейкоцитов в семенной жидкости обусловлено их ролью в удалении избытка сперматозоидов, дебриса, патогенов, а также элиминации незрелых и поврежденных мужских половых клеток. Однако избыточное количество лейкоцитов в семенной жидкости, характерное при воспалительных процессах, негативно вли-

яет на сперматозоиды. Лейкоциты и продукты их производства (активные формы кислорода, цитокины, простаноиды, промежуточные формы окисления азота) являются основными этиопатологическими факторами мужского и женского бесплодия [2]. Так макрофаги способны модулировать иммунный ответ, направленный против сперматозоидов, ограничивая их под-

вижность путем фагоцитоза [2]. Но попадание семенной жидкости в женский репродуктивный тракт обуславливает дополнительную миграцию нейтрофилов [3]. Оплодотворение и нормальная имплантация реализуются благодаря тонким механизмам взаимодействия компонентов, как половой, так и иммунной систем [1]. Нейтрофилы – наиболее представительная популяция среди иммунокомпетентных клеток женского репродуктивного тракта в количественном и функциональном отношении. Зачастую семенная жидкость, показатели спермограммы которой укладываются в нормы, регламентированные ВОЗ, характеризуется лейкоцитоспермией [4]. При этом инфекции половых путей не выявляются. Поэтому целью нашей работы явилась оценка влияния компонентов семенной жидкости, характеризующейся лейкоцитоспермией, на функциональную активность нейтрофилов, выделенных из периферической крови. Изучение функциональных свойств нейтрофилов чистой фракции позволяет исключить влияние факторов микроокружения, характерных для тканей и секретов слизистых оболочек, куда мигрируют данные клетки в ходе жизненного цикла.

**Материалы и методы.** Проведена оценка функциональных свойств нейтрофилов, выделенных из периферической крови 33 здоровых женщин (средний возраст  $26,3 \pm 2,1$  года) в первую фазу менструального цикла, под действием компонентов семенной жидкости 33 мужчин (заключение спермиологического анализа – нормозооспермия,  $n=17$ ) и мужчин ( $n=16$ ), семенная жидкость которых характеризуется лейкоцитоспермией (средний возраст обследуемых мужчин  $27,4 \pm 3,5$  года), *in vitro*. Спермиологический анализ включал стандартные показатели согласно рекомендациям ВОЗ. Отсутствие инфекций половых путей среди мужчин подтверждалось методом ПЦР в реальном времени. Семенная жидкость центрифугировалась 3000 об/мин в течение 10 минут, и было получено 2 фракции: клеточные элементы эякулята, которые доводили физиологическим раствором до начальной концентрации сперматозоидов, и надосадочная жидкость. Исследуемыми показателями функциональных свойств нейтрофилов явились: лизосомальная и фагоцитарная активность, внутриклеточный кислородзависимый метаболизм данных клеток. В качестве контроля использовали взвесь нейтрофилов, выделенных из периферической

крови и инкубированных с физиологическим раствором. Группы сравнения представлены нейтрофилами, выделенными из периферической крови и инкубированными с компонентами семенной жидкости, характеризующейся нормозооспермией, и нейтрофильными гранулоцитами, выделенными из периферической крови и инкубированными с компонентами семенной жидкости, характеризующейся лейкоцитоспермией. Данные анализировали с применением непараметрического метода U-критерий Манна-Уитни для расчета уровня значимости в пакете SPSS.Statistics (version 17).

**Результаты.** При взаимодействии с клеточными элементами эякулята, полученными из семенной жидкости с лейкоцитоспермией были получены следующие результаты функциональной активности нейтрофилов, выделенных из периферической крови. При сравнении групп нейтрофилов, инкубированных с клеточными элементами эякулята, полученными из образцов семенной жидкости, характеризующейся нормозооспермией и лейкоцитоспермией, фиксировались более высокие значения активности НСТ-теста, как спонтанного, так и индуцированного в группе нейтрофилов, инкубированных с клеточными элементами эякулята, полученными из семенной жидкости с лейкоцитоспермией. При изучении показателей фагоцитарной активности отмечалось снижение всех изучаемых показателей в исследуемых группах по сравнению с группой контроля. При сравнении группы нейтрофилов, инкубированных с надосадочной жидкостью, полученной из эякулята, характеризующегося лейкоцитоспермией, с группой контроля обнаружены следующие изменения: тенденция к увеличению уровня лизосомальной активности, тенденция к увеличению показателей кислородзависимого метаболизма нейтрофилов, значительно более низкие значения показателей фагоцитарной активности изучаемых клеток. При сравнении показателей функциональной активности групп нейтрофилов, инкубированных с надосадочной жидкостью, полученной, как от здоровых мужчин, так и мужчин с лейкоцитоспермией, статистически значимых различий не обнаружено.

Таким образом, под действием компонентов семенной жидкости, характеризующейся лейкоцитоспермией, отмечены общие тенденции к снижению лизосомальной, фагоцитарной активности и увеличению показателей НСТ-теста.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Савочкина А. Ю., Савельева А. А., Маякова В. Б., Орнер И. Ю. и др. Российский иммунологический журнал 2014, 8 (17), 2 (1), 135-137.
2. Kurzawa R. Ann Acad Med Stetin 1997, 43, 79-97.
3. Rodriguez-Martinez H., Saravia F., Wagren M., Martinez E. A. et al. J Reprod Immunol 2010, 84 (1), 57-65.
4. Solis E. A., Gatti V. N., Bouvet B. R., Brufman A. S. et al. Arch Esp Urol 2000, 53 (2), 101-105.

**EXPOSURE TO THE COMPONENTS OF SEMINAL FLUID CHARACTERIZED BY LEUKOCYTOSPERMIA ON FUNCTIONAL CAPACITY OF NEUTROPHILS ISOLATED FROM PERIPHERAL BLOOD**

**Saveleva A. A., Dolgushin I. I., Savochkina A. Yu., Orner I. Yu.**

*South Ural State Medical University (SUSMU), Chelyabinsk, Russia*

Negative impact of leukocytes is known in relation to spermatozoa. However, seminal fluid itself affects the female reproductive tract, particularly the immunocompetent cells. Among these cells, the neutrophils are the most representative. This work demonstrates the influence of cellular elements of ejaculate and the supernatant obtained from the seminal fluid, characterized by leukocytospermia on the functional activity of neutrophils isolated from peripheral blood. Functional status of neutrophils was evaluated by lysosomal and phagocytic activity, as well as via the assessment of intracellular oxygen-dependent metabolism.

**СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ НЕЙТРОФИЛОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ, И НЕЙТРОФИЛОВ УРОГЕНИТАЛЬНОГО ТРАКТА ЖЕНЩИН В РАЗЛИЧНЫЕ ФАЗЫ МЕНСТРУАЛЬНОГО ЦИКЛА**

**Самусева И. В., Маркова В. А., Никушкина К. В., Батурина И. Л., Логинова Ю. В., Никонова Т. И.**

*ГБОУ ВПО ЮУГМУ Минздрава России, Челябинск, Россия*

В обзоре приводится сравнительная оценка функциональной активности интактных нейтрофилов, выделенных из периферической крови, и нейтрофилов цервикального и вагинального секретов женщин в первую и вторую фазы менструального цикла. Установлено, что у интактных нейтрофилов, выделенных из периферической крови, и нейтрофилов цервикального и вагинального секретов независимо от фазы менструального цикла наблюдаются различия в функциональной активности. Наибольшей функциональной активностью обладают нейтрофилы цервикального секрета. У нейтрофилов, выделенных из периферической крови, и нейтрофилов урогенитального тракта женщин в течение менструального цикла происходит рост показателей фагоцитарной функции и их способности к формированию внеклеточных сетей.

*Ключевые слова:* нейтрофильные гранулоциты, фагоциты, нейтрофильные внеклеточные ловушки.

**Актуальность.** Согласно современным представлениям, нейтрофильные гранулоциты являются одной из самых многочисленных клеточных популяций в организме и в крови человека. Это высоко дифференцированные клетки гранулоцитарного роста

с многодольчатым сегментированным ядром и набором гранул [2]. Данные литературы свидетельствуют о том, что дисфункции нейтрофилов приводят к тяжелым формам бактериальных инфекций [4], что подчеркивает ключевую роль нейтрофилов в обеспечении врожденного иммунитета. Свои основные эффекторные функции нейтрофильные гранулоциты осуществляют в тканевых депо и в секретах слизистых оболочек [3]. Нейтрофильные гранулоциты играют важную роль в противоинфекционной защите женского репродуктивного тракта благодаря своей способности поглощать патогены и высвобождать широкий спектр противомикробных компонентов, в том числе и формировать внеклеточные ловушки [5]. В настоящее время разработаны способы обнаружения нейтрофильных внеклеточных ловушек (НВЛ), которые позволяют изучить их, как в слизистых секретах, так и в выделенной фракции нейтрофилов периферической крови.

**Целью работы** являлось сравнение функциональной активности интактных нейтрофилов, выделенных из периферической крови, и нейтрофилов урогенитального тракта женщин в первую и вторую фазы менструального цикла.

**Используемые методы.** В эксперименте приняли участие условно здоровые женщины в возрасте от 18 до 36 лет, у которых забирали венозную кровь, цервикальный и вагинальный секреты. Выделение чистой фракции нейтрофилов проводилось на двойном градиенте плотности фиколл-верографина (чистота составляла 98–100%). Полученную клеточную концентрацию доводили до концентрации  $5 \cdot 10^6$  кл/л. Для изучения НВЛ в чистой фракции нейтрофилов клеточную взвесь окрашивали флуоресцентным ядерным красителем Sytox Green и готовили препарат «раздавленная капля». Оценку препаратов проводили с помощью люминесцентного микроскопа. Для подсчета количества нейтрофильных внеклеточных ловушек в цервикальном и вагинальном секретах был применён способ обнаружения нейтрофильных внеклеточных ловушек в мукозальных секретах (Пат. № 2463349 И. И. Долгушин, Ю. С. Андреева, А. Ю. Савочкина). Оценку внутриклеточного кислородзависимого метаболизма нейтрофильных гранулоцитов мукозальных секретов проводили с помощью

НСТ-теста в модификации Маянского А. Н. и Виксмана М. К. (1979). Для исследования фагоцитарной функции нейтрофильных гранулоцитов использовали модифицированный метод Фрейдлин И. С. (1986 г.).

**Результаты.** В первую фазу менструального цикла содержание внеклеточных сетей нейтрофильных гранулоцитов значительно различается во всех изучаемых биологических жидкостях. Максимальный процент НВЛ регистрируется в цервикальном секрете, минимальный – у нейтрофилов, выделенных из периферической крови. Показатели НСТ-теста и фагоцитарной функции интактных нейтрофилов значительно различались во всех биологических средах, и были наиболее выражены у нейтрофильных гранулоцитов цервикального секрета. Самые низкие показатели внутриклеточной бактерицидной активности были зарегистрированы у нейтрофильных гранулоцитов вагинального секрета.

Во вторую фазу менструального цикла результаты носят аналогичный характер. Так, при сравнительной оценке функциональной активности интактных нейтрофильных гранулоцитов, выделенных из периферической крови, и нейтрофилов урогенитального тракта женщин наблюдалась разнородность показателей в зависимости от условий локализации нейтрофильных гранулоцитов (т.е. исследуемого материала), что указывает на гетерогенность популяции нейтрофилов, циркулирующих в периферической крови, и клеток, присутствующих на слизистых оболочках урогенитального тракта женщин. Наиболее выраженными кислородзависимыми эффекторными системами обладают интактные жизнеспособные нейтрофильные гранулоциты цервикального секрета. Наименьший уровень показателей НСТ-теста наблюдается у клеток вагинального секрета. Способность к фагоцитозу, его эффективность, а также активность процесса формирования внеклеточных сетей нейтрофильными гранулоцитами, также, по видимому, определяется их принадлежностью к тому или иному клеточному пулу, и зависит от их локализации. Установлено, что максимальный процент клеток, вступивших в фагоцитоз, и наибольшее количество внеклеточных волокон ДНК нейтрофилов на 30 минуте инкубации регистрируется в цервикальном секрете вне зависимости от фазы менструального цикла.

Далее был проведен сравнительный анализ функциональной активности интактных нейтрофильных гранулоцитов в первую фазу менструального цикла с аналогичными показателями нейтрофилов, изучаемых во вторую фазу менструального цикла.

Установлено, что у женщин во вторую фазу менструального цикла по сравнению с первой фазой происходит рост фагоцитарной функции и способности к образованию внеклеточных сетей при одновременном снижении показателей НСТ-теста нейтрофильных гранулоцитов урогенитального тракта и нейтрофилов, выделенных из периферической крови женщин.

Полученные данные можно объяснить тем, что морфологически не различимые и выполняющие одинаковые функции клетки одной популяции могут быть функционально неравнозначными и проявлять неодинаковую специфическую функциональную активность, то есть быть функционально неоднородными.

Это подтверждают результаты нашего исследования, которые согласуются с данными литературы [1]. Таким образом, нейтрофильные гранулоциты отличаются высоким уровнем функциональной мобильности и играют важную роль в противомикробной защите женского репродуктивного тракта, благодаря своей способности поглощать патогены.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Герасимов И. Г., Калуцкая О. А. // Цитология. – 2000. – Т. 42, N 2. – С. 160-165.
5. Долгушин И. И., Бухарин О. В. Нейтрофилы и гомеостаз, 2001 г.
3. Долгушин И. И., Маркова В. А., Савочкина А. Ю., Пегушина И. В., Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 2013. Т. 156. № 8, С. 206-208.
4. Нестерова И. А., Ковалева С. В., Чудилова Г. А., Ломтатидзе Л. В., Евлевский А. А., Иммунология, 2012. Т. 33. № 5, С. 281-287.
5. Brinkmann Volker, Arturo Zychlinsky. Science, 2004. Vol. 303, P.1532-1535.

### COMPARATIVE EVALUATION OF THE FUNCTIONAL ACTIVITY OF THE NEUTROPHILS ISOLATED FROM PERIPHERAL BLOOD AND THE NEUTROPHILS OF UROGENITAL TRACT OF WOMEN IN VARIOUS PHASES OF THE MENSTRUAL CYCLE

Samuseva I. V., Markova V. A., Nikushkina K. V., Baturina I. L.,  
Loginova U. V., Nikonova T. I.,

*State Educational Institution of Higher Professional Education "South Ural State Medical University" Ministry of Health of the Russian Federation, Chelyabinsk, Russia*

This review provides a comparative assessment of the functional activity of intact neutrophils isolated from peripheral blood and neutrophils of cervical and vaginal secretions from women in the first and second phases of the menstrual cycle. It was established that intact neutrophils isolated from peripheral blood and neutrophils of cervical and vaginal secretions, regardless of the phase of the menstrual cycle demonstrated the differences in the functional activity. The highest functional activity possessed the neutrophils of cervical secretion. In neutrophils isolated from the peripheral blood and neutrophils of the urogenital tract of women during the menstrual cycle, the increase of the parameters of the phagocyte functions, and their ability to form extra-cellular networks occurred.

## ВЗАИМОСВЯЗЬ ХАРАКТЕРА СИНТЕЗА АПОПТОЗ-РЕГУЛИРУЮЩИХ ГЕНОВ С ИНТЕНСИВНОСТЬЮ ПРОЛИФЕРАТИВНЫХ ПРОЦЕССОВ В МИОМАТОЗНОМ УЗЛЕ

Сотникова Н. Ю., Воронин Д. Н., Кирсанов А. Н.

ФГБУ «Ивановский НИИ материнства и детства им. В. Н. Городкова»  
Минздрова России, Иваново, Россия

При исследовании миоматозных узлов больших размеров, было установлено, что наличие пролиферативных процессов в тканях опухоли сопровождается одновременным увеличением экспрессии мРНК анти-апоптотического фактора XIAP и повышением синтеза про-апоптотических факторов PPAR $\gamma$  и PTEN, что может являться важным элементом в патогенезе доброкачественного роста миомы матки.

*Ключевые слова:* лейомиома, пролиферация, генная регуляция апоптоза.

Лейомиома является доброкачественной гормонально-опосредованной опухолью, которая встречается у 20–50% женщин репродуктивного возраста. Предполагается, что важную роль в усилении роста опухоли играют не только половые стероидные гормоны, но и провоспалительные цитокины, хемокины и факторы роста, синтез и продукция которых в миоматозном узле резко повышены [1]. При этом до настоящего времени нет единого представления о том, как регулируются пролиферативные процессы в миометрии и почему рост миомы практически никогда не сопровождается злокачественным перерождением. Известно, что важную роль в поддержании тканевого гомеостаза играет сбалансированность процессов пролиферации и апоптоза [2]. Литературные данные о характере регуляции апоптоза в ткани миоматозного узла немногочисленны. Ввиду этого целью работы было установить особенности синтеза про- и анти-апоптотических факторов в ткани миоматозных узлов больших размеров в зависимости от интенсивности в них пролиферативных процессов для уточнения механизмов регуляции доброкачественного роста опухоли.

Работа была выполнена на базе федерального государственного бюджетного учреждения «Ивановский научно-исследовательский институт материнства и детства имени В. Н. Городкова» Министерства здравоохранения РФ. В условиях гинекологической клиники обследо-

вано 10 пациенток с миомой матки больших размеров (диаметр узла – свыше 7 см), поступивших на обследование и оперативное лечение. Материалом для исследования служили биоптаты миоматозных узлов. Определение экспрессии мРНК ki-67, X-связанного белка ингибитора апоптоза (XIAP), фосфатазы и гомолога тензина (PTEN), и рецептора-активатора пролиферации пероксисом (PPAR $\gamma$ ) в ткани миоматозных узлов осуществлялось методом количественной полимеразной цепной реакции в масштабе реального времени (RT-PCR) с нормализацией относительно мРНК  $\beta$ 2-микроглобулина.

На первом этапе нашего исследования была проведена оценка экспрессии в ткани опухоли маркера пролиферации – ki-67, и, в зависимости от его наличия, или отсутствия исследуемые миоматозные узлы были разделены на два типа: пролиферирующие и без признаков клеточной пролиферации. Дифференцированный анализ данных по экспрессии генов, регулирующих апоптоз, в ткани миоматозных узлов в зависимости от типа их роста показал, что в опухолях, экспрессирующих ki-67, была выявлена значительно более высокая экспрессия мРНК XIAP, PPAR $\gamma$  и PTEN по сравнению с теми миоматозными узлами, в которых экспрессия ki-67 не выявлена. Таким образом, усиление пролиферативных процессов в ткани миомы происходило на фоне

высокой экспрессии генов, обладающих как про-апоптотическим (PPAR $\gamma$  и PTEN), так и анти-апоптотическим действием (XIAP). Известно, что XIAP является одним из ингибиторов апоптоза, который способен связываться с каспазами-9, -3, -7, инактивировать их активность, останавливая, таким образом, протеолитический каскад и обеспечивая защиту от Fas-индуцированного апоптоза [2]. Поэтому усиление его синтеза в ткани миомы может быть одним из триггерных факторов, запускающих клеточную пролиферацию, о наличии которой свидетельствует выявленный нами синтез ki-67. Однако высокий уровень экспрессии анти-апоптотического гена, по нашим данным, сопровождался повышением синтеза факторов с про-апоптотическим действием – PPAR $\gamma$  и PTEN. В экспериментах *in vitro* и *in vivo* было показано, что PPAR $\gamma$  способен угнетать рост опухолевых клеток и подавлять процессы метастазирования [3]. При этом активация PPAR $\gamma$  его специфическими лигандами приводила к индукции апоптоза и подавляла одновременно действие анти-апоптотических факторов [3]. Заслуживает особого внимания выявленная нами усиленная экспрессия мРНК про-апоптотического фактора PTEN в ткани пролиферирующих миоматозных узлов. PTEN является эволюционно консервативной фосфатазой двойной специфич-

ности, которая удаляет фосфаты с белковых и липидных субстратов и ингибирует киназный сигнальный каскад по PI3K/Akt пути, подавляя активность клеточной пролиферации и индуцируя апоптоз [4]. Предполагается, что этот фактор ограничивает бесконтрольное деление клеток, предотвращая развитие, васкуляризацию и злокачественное перерождение опухоли [4]. Поэтому высокий уровень синтеза PTEN в ткани миоматозных узлов, по-видимому, является одним из основных механизмов, обеспечивающих доброкачественный рост этой опухоли. Таким образом, одновременное повышение синтеза анти- и про-апоптотических факторов в ткани пролиферирующей миомы матки, может с одной стороны, играть важную роль в инициации быстрого роста опухоли, а с другой стороны, определять доброкачественных характер роста лейомиомы.

Работа поддержана грантом РФФИ 15-04-05042.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Chegini N. Semin Reprod Med. 2010, 28 (3), 180-203.
2. Schimmer A. D., Dalili S., Batey R. A., Riedl S. J. Cell. Death. Differ. 2006, 13, 179-188.
3. Elrod H. A., Sun S. Y. PPAR Res. 2008; 704165.
4. Keniry M., Parsons R. Oncogene. 2008, 27, 5477-5485.

### RELATIONSHIP BETWEEN THE CHARACTER OF APOPTOSIS-REGULATING GENE SYNTHESIS AND PROLIFERATION INTENSITY IN LEIOMYOMA TISSUE

Sotnikova N. Yu., Voronin D. N., Kirsanov A. N.

V. N. Gorodkov Federal State Research Institute of Maternity and Childhood, Ivanovo, Russia

Investigation of the large leiomyoma tissues demonstrated that high activity of the proliferation in tumor tissue was accompanied by the simultaneous increase of the anti-apoptotic factor XIAP and pro-apoptotic factors PPAR $\gamma$  and PTEN mRNA expression. These findings might be important components of the pathogenesis of benign nature of leiomyomas.



## ДИФФЕРЕНЦИРОВКА В-КЛЕТОК ПАМЯТИ У ЖЕНЩИН С ЗАДЕРЖКОЙ РОСТА ПЛОДА

Фролова М. В., Кудряшова А. В., Сотникова Н. Ю.

ФГБУ «Ив НИИ М и Д им. В. Н. Городкова» Минздрава России,  
Иваново, Россия.

Задержка роста плода (ЗРП) характеризуется изменениями антителозависимых реакций иммунной системы. Цель: изучить особенности дифференцировки В-клеток памяти у женщин с ЗРП. Обследовали женщин с неосложненной беременностью, ЗРП. При ЗРП было выявлено повышение уровня «непереключенных» (CD27<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>) В-клеток памяти и отсутствие достоверных различий в содержании наивных (CD27<sup>-</sup>IgD<sup>+</sup>), активированных В-лимфоцитов (CD20<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>CD95<sup>+</sup>) и «переключенных» В-клеток памяти (CD27<sup>+</sup>IgD<sup>-</sup>).

*Ключевые слова:* задержка роста плода, В-клетки памяти.

Задержка роста плода (ЗРП) является одной из универсальных реакций, связанной с внутриутробным неблагополучием. Патологические механизмы, определяющие формирование данной патологии, многообразны и до конца не определены. Особый интерес вызывает изучение иммуноопосредованных механизмов задержки роста плода. Известно, что при ЗРП происходят существенные изменения антителозависимых реакций иммунной системы, начиная с ранних сроков гестации [1, 3]. Это может обуславливать формирование длительно-живущих В-клеток памяти. В динамике гуморального иммунного ответа формируются два компартмента В-клеток памяти: плазматические клетки, продуцирующие антитела (эффекторные клетки памяти) и центральные клетки памяти, способные генерировать и пополнять пул плазматических клеток в результате антигензависимых и -независимых механизмов [2]. Кроме того, центральные В-клетки памяти принимают участие в презентации антигена Т-лимфоцитам, продуцируют широкий спектр цитокинов и хемокинов [2]. Для идентификации различных пулов В-клеток предлагается использовать классификацию, основанную на экспрессии IgD и CD27 молекул [2, 4]. Популяцию CD27<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup> рассматривают как наивные В-лимфоциты. Популяция В-клеток памяти неоднородна, и состоит, как минимум, из трех различных пулов. CD27<sup>+</sup> клетки памяти подразделяют на IgD<sup>+</sup>, так называемые,

«непереключенные» (Non-switched) и IgD<sup>-</sup> «переключенные» (Switched) клетки памяти. Кроме того, выделяют фракцию «дважды негативных» (Double Negative) В-клеток памяти (CD27<sup>-</sup>IgD<sup>-</sup>), функция которых в настоящее время остается мало изученной [2]. Существуют различные мнения и по поводу происхождения CD27<sup>-</sup>IgD<sup>-</sup> В-лимфоцитов: развитие путем трансформации из наивных В-клеток, под действием поликлональных стимулов за счет увеличения антигенной нагрузки; потеря со временем экспрессии CD27 частью классических клеток памяти; формирование в процессе экстрафолликулярных иммунных реакций, или неполноценных иммунных ответов, идущих в зародышевых центрах периферических лимфоидных органов [2, 5].

Целью проведенного исследования было изучить особенности созревания и дифференцировки В-лимфоцитов при беременности, осложненной задержкой роста плода. В 32-36 недель гестации обследовали: 20 женщин с неосложненным течением беременности (контрольная группа); 34 женщины, родивших детей с ЗРП (группа ЗРП). Отдельную группу представили 8 женщин с ЗРП по данным УЗ-исследования, но родивших детей без ЗРП (группа ЗРП→нормотрофия при рождении). Все женщины с ЗРП получали одинаковую терапию, направленную на улучшение работы маточно-плацентарного комплекса и метаболических процессов. Методом точной цитофлуориметрии в общей популя-

ции периферических CD19<sup>+</sup> В-лимфоцитов определяли содержание: наивных CD27-IgD<sup>+</sup> клеток; активированных CD20<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>CD95<sup>+</sup> клеток; CD27<sup>+</sup>IgD<sup>±</sup>, «непереключенных» CD27<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>, и «переключенных» CD27<sup>+</sup>IgD<sup>-</sup> клеток памяти; CD27-IgD<sup>-</sup> «двойных негативных» клеток.

Анализируя полученные данные в группе женщин, родивших детей с ЗРП, мы установили, что в популяции В-лимфоцитов уровень наивных CD27-IgD<sup>+</sup> клеток, имел тенденцию к снижению, а содержание активированных CD20<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>CD95<sup>+</sup> лимфоцитов не имело отличий по сравнению с показателями контрольной группы ( $p > 0,05$  в обоих случаях). Сравнение двух исследуемых групп по уровню В-клеток памяти с фенотипом CD27<sup>+</sup>IgD<sup>±</sup> показало, что в группе женщин с ЗРП данный параметр достоверно повышался по сравнению с неосложненной беременностью ( $p = 0,005$ ), что было обусловлено ростом содержания пула «непереключенных» В-лимфоцитов памяти по сравнению с таковым в группе контроля ( $p = 0,004$ ). Уровни «переключенных» В-лимфоцитов памяти и «дважды негативных» клеток соответствовали таковым в группе женщин без ЗРП ( $p > 0,05$  в обоих случаях). В группе ЗРП → нормотрофия при рождении все исследуемые показатели соответствовали таковым в контрольной группе, а уровень «непереключенных» клеток памяти был достоверно снижен по сравнению с таковыми в группе женщин, родивших детей с ЗРП ( $p < 0,001$ ).

Результаты проведенных исследований свидетельствуют об изменении характера дифференцировки В-лимфоцитов в периферической крови матери при ЗРП. Как известно, количество наивных В-клеток отражает способность к нормальной гомеостатической пролиферации В-лимфоцитов, а также определяет антиген-индуцированную дифференцировку в зародышевых центрах периферических лимфоидных органов. Отмеченная нами тенденция к снижению данного пула может косвенно свидетельствовать об усилении процессов дифференцировки В-лимфоцитов до конечных этапов формирования клеток памяти при ЗРП. Это предположение подтверждается нашими данными о росте общего уровня CD27<sup>+</sup>IgD<sup>±</sup> В-лимфоцитов. Существенное различие двух CD27<sup>+</sup> пулов В-клеток памя-

ти определяется поверхностной экспрессией IgD [2, 5]. «Переключенные» клетки памяти теряют поверхностные иммуноглобулиновые рецепторы класса D, но в результате процесса переключения изотипов приобретают способность экспрессировать IgG и IgA. «Непереключенные» В-клетки памяти продолжают экспрессировать IgD рецепторы в сочетании с поверхностными IgM и не проходят дальнейший этап переключения изотипов иммуноглобулинов [2, 4]. Известно, что «непереключенные» (CD27<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>) периферические В-лимфоциты памяти возникают из активированных В-клеток, под действием сильных сигналов от CD4<sup>+</sup> Т-клеток в начале реакции на антигенную стимуляцию, в то время как большинство «переключенных» (CD27<sup>+</sup>IgD<sup>-</sup>) В-клеток памяти формируются в герминативных центрах [4]. Следует отметить, что «переключенные» В-лимфоциты памяти несут на своей поверхности BCR, обладающий высоким сродством к антигену; тогда как «непереключенные» экспрессируют низкоаффинный В-клеточный рецептор. Функциональная характеристика двух исследуемых пулов тоже различна [4]. «Переключенные» В-клетки памяти обуславливают быстрый иммунный ответ, за счет кооперации с клетками памяти в популяции TFH. Значимость «непереключенных» В-клеток памяти во вторичной реакции на антиген не высока, однако предполагается их важная роль при повторной инфекции с мутантными версиями исходного патогена. Вероятно, усилением функциональной активности «непереключенных» В-клеток памяти определяется отмеченное нами ранее повышение сывороточного уровня IgM на всем протяжении гестации у женщин с ЗРП (Сотникова Н. Ю., и др., 2009).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Фролова М. В., Сотникова Н. Ю., Милеева П. Л. Российский иммунологический журнал. 2015, 9 (18), № 1 (1), 193-194.
2. Sanz I., Wei C., Lee F. E. Semin. Immunol. 2008, 20 (1), 67-82.
3. Сотникова Н. Ю., Кудряшова А. В. Акушерство и гинекология. 2008, 1, 23-26.
4. Taylor J. J., Jenkins M. K., Pape K. A.. Trends Immunol. 2012, 33 (12), 590-597.
5. Palma P., Rinaldi S., Cotugno N., et al. Hum Vaccin Immunother. 2014, 10 (7), 2083-2088.

## THE DIFFERENTIATION OF MEMORY B CELLS IN WOMEN WITH INTRAUTERINE FETAL GROWTH RETARDATION

Frolova M. V., Kudryashova A. V., Sotnikova N. Yu.

V. N. Gorodkov Federal State Research Institute of Maternity and Childhood, Ivanovo, Russia

Intrauterine fetal growth retardation (IUGR) is characterized by changes in antibody-dependent immune reactions. The aim of the work was to study the differentiation of memory B cells in women with IUGR. Women with IUGR and healthy women were examined. The increase of the level of «non switched» (CD27<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>) memory B cells was found. An absence of significant difference in the number of naïve (CD27<sup>-</sup>IgD<sup>+</sup>), activated (CD20<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>CD95<sup>+</sup>) and «switched» B lymphocytes (CD27<sup>+</sup>IgD<sup>-</sup>) was noted.

---

---

## ИССЛЕДОВАНИЕ ИММУННОГО ОТВЕТА К МНС У ЖЕНЩИН С УГРОЗОЙ ПРЕРЫВАНИЯ БЕРЕМЕННОСТИ И ВЫКИДЫШЕМ

Тренина Т. И.<sup>1</sup>, Бушмелева Н. Н.<sup>2</sup>, Шайдулина Р. Р.<sup>1</sup>,  
Гумерова Д. Р.<sup>1</sup>, Коренчук Ю. В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБОУ ВПО «Удмуртский государственный университет»; <sup>2</sup>ФГБОУ ВПО «Ижевская государственная медицинская академия», Ижевск, Россия

Целью работы было выяснить, какие изменения в активности лимфоцитов специфичных к МНС плода и уровне антиидиотипических антител против лимфоцитов специфичных к МНС плода могут привести к выкидышу. Обнаружено, что у женщин с диагнозом УПБ активность лимфоцитов против МНС плода, а также уровень ингибирующих антиидиотипических антител к МНС плода ниже, чем у женщин с нормально протекающей беременностью. Однако уровень ингибирующих антиидиотипических антител к МНС плода соразмерен активности лимфоцитов к МНС плода, следовательно, причина угрозы выкидыша не в отсутствии контроля активности лимфоцитов против МНС, а в слабой активности лимфоцитов к МНС антигенам плода. Другая причина УПБ, ведущей к выкидышу – нарушение регуляции активности лимфоцитов к МНС плода, проявляющееся в том, что антиидиотипические антитела к МНС оказывают стимулирующий, а не ингибирующий эффект на активность лимфоцитов к МНС плода.

**Ключевые слова:** Главный комплекс гистосовместимости (МНС), антиидиотипические антитела, угроза прерывания беременности (УПБ), активность лимфоцитов.

Механизмы, позволяющие полуаллогенному трансплантату, которым является плод для иммунной системы матери, сохраняться и развиваться в ее организме, в настоящее время не ясны. Также неизвестно, какие изменения в иммунной системе матери приводят к выкидышу [1]. Имеющиеся в литературе факты указывают на то, что причиной невынашивания беременности может быть как очень сильная реакция иммунной системы матери к МНС антигенам плода, вследствие недостаточности регуляторного контроля, так и слабая ре-

акция, наблюдаемая, например, при сходстве МНС антигенов супругов. Целью работы было выяснить, какие изменения в активности лимфоцитов специфичных к МНС плода и уровне антиидиотипических антител против лимфоцитов специфичных к МНС плода могут быть причиной выкидыша.

Исследование проведено на базе 9-й Городской клинической больницы МЗ УР, г. Ижевск. Были исследованы небеременные женщины (n=23), беременные с нормально протекающей беременностью (n=32), и женщины, у ко-

торых беременность сопровождалась угрозой прерывания (УПБ) (n=25). Все женщины дали информированное согласие на участие в исследовании. Определяли пролиферативную активность лимфоцитов женщин к МНС плода методом поглощения глюкозы в одноплавленной смешанной культуре лимфоцитов с лимфоцитами мужа. Также у женщин исследовали уровень антиидиотипических антител к МНС плода по интенсивности ингибирования или стимулирования пролиферативной активности лимфоцитов женщины, вызванной лимфоцитами мужа, в присутствии аутологичной сыворотки.

Обнаружено, что у женщин с диагнозом УПБ активность лимфоцитов против МНС плода, а также уровень ингибирующих антиидиотипических антител к МНС плода ниже, чем у женщин с нормально протекающей беременностью. В тоже время при УПБ уровень антиидиотипических антител к МНС соразмерен активности лимфоцитов к МНС плода, т.е. низкому уровню активности лимфоцитов к МНС соответствует низкий уровень антиидиотипических антител к МНС. Известно, что антиидиотипические антитела являются ключевым фактором контроля иммунного ответа к МНС плода при беременности [2]. Их наличие при УПБ в количестве соразмерном активности лимфоцитов против МНС указывает на то, что причина угрозы прерывания беременности не в отсутствии контроля активности лимфоцитов против МНС, а в слабой активности лимфоцитов к МНС

антигенам плода. Следовательно, активность лимфоцитов матери к МНС антигенам плода не менее важна для сохранения плода в организме, и низкая активность может привести к выкидышу.

У 2 из 25 исследованных женщин с диагнозом УПБ беременность завершилась выкидышем. Особенностью исследуемых показателей у этих беременных женщин, в отличие от других женщин с диагнозом УПБ, была относительно высокая активность лимфоцитов к МНС плода, сравнимая с таковой у женщин с нормально протекающей беременностью. Однако в отличие от нормальной беременности, при которой высокая активность лимфоцитов была ассоциирована с ингибирующим эффектом антиидиотипических антител к МНС, при УПБ, завершившейся выкидышем, антиидиотипические антитела стимулировали активность лимфоцитов против МНС плода. На основании полученных фактов можно предполагать, что причиной УПБ и выкидыша является нарушение регуляции активности лимфоцитов против МНС плода антиидиотипическими лимфоцитами.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Сидельникова В. М. Подготовка и ведение беременности у женщин с привычным невынашиванием: метод. пособия и клин. протоколы/ 3-е изд. – М.: МЕДпресс-информ, 2013, 224с.: ил.
2. Koichi Ito, Tadao Tanaka, Norio Tsutsumi, Fumiya Obata, Noboru Kashiwagi. // Human reproduction vol.14 no.3 p.p.650-655, 1999.

#### STUDY OF IMMUNE RESPONSE TO MHC IN WOMEN WITH THREATENED ABORTION OR MISCARRIAGE

Tronina T. I.<sup>1</sup>, Bushmeleva N. N.<sup>2</sup>, Shaydulina R. R.<sup>1</sup>,  
Gumerova D. R.<sup>1</sup>, Korenchuk J. V.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Udmurt State University; <sup>2</sup>Izhevsk State Medical Academy, Izhevsk, Russia

The goal was to figure out which changes in the activity of lymphocytes specific for MHC fetus and the level of anti-idiotypic antibodies against lymphocytes specific for MHC fetus may lead to miscarriage. It was found that women diagnosed with TAM activity of lymphocytes against MHC fetus, as well as the level of anti-idiotypic antibodies to inhibit MHC fetus is lower than that of women with normal pregnancy. However, the level of anti-idiotypic antibodies to inhibit MHC fetus commensurate activity of lymphocytes to the MHC of the fetus, therefore, the cause of threatened abortion is not the lack of control activity of lymphocytes against MHC, and weak activity of lymphocytes to MHC antigens of the fetus. Another reason for the TAM, leading to miscarriage – dysregulated activity of lymphocytes to the MHC of the fetus, which manifests itself in the fact that anti-idiotypic antibodies to the MHC has a stimulating rather than inhibiting effect on the activity of lymphocytes to the MHC fetus.

## ОСОБЕННОСТИ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ЭНДОТЕЛИЯ И РЕГУЛЯЦИИ АНГИОГЕНЕЗА В ПЕРВОМ ТРИМЕСТРЕ БЕРЕМЕННОСТИ, ИНДУЦИРОВАННОЙ ВРТ

Чистякова Г. Н., Газиева И. А., Цывьян П. Б.,  
Кожекина Ю. Н.

ФГБУ «НИИ ОММ» Минзграва России, Екатеринбург, Россия

С целью оценки функционального состояния эндотелия и особенностей регуляции ангиогенеза в первом триместре беременности, индуцированной ВРТ, проведено обследование 48 женщин с одноплодной беременностью, наступившей в результате экстракорпорального оплодотворения и переноса эмбрионов и 30 женщин с одноплодной беременностью, наступившей естественным путем. Установлено, что первый триместр беременности, индуцированной ВРТ, характеризуется повышением содержания эндотелина-1, общего и эндогенного нитрита на фоне снижения уровня как про- (VEGF), так и антиангиогенных (эндоглин) факторов. Таким образом, нарушение функционального состояния эндотелия в условиях надфизиологической гормональной поддержки беременности в программах ВРТ сопровождается дисрегуляцией процессов ангиогенеза, что впоследствии может быть причиной гестационных осложнений.

*Ключевые слова:* первый триместр беременности, вспомогательные репродуктивные технологии, эндотелий, ангиогенез.

Индукция суперовуляции в программах экстракорпорального оплодотворения и переноса эмбрионов (ЭКО и ПЭ) связана со значительной экзогенной гормональной нагрузкой на организм женщины. При беременности, индуцированной применением вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ), повышается частота встречаемости различных осложнений, связанных с проявлениями эндотелиальной дисфункции. Нарушение функций эндотелия при беременности может быть как первичным, так и связанным с воздействием различных повреждающих факторов, в том числе с биохимическими и гемостазиологическими изменениями, обуславливающими гиперкоагуляционные сдвиги [1,2]. В связи с тем, что продукция эндотелиальных факторов во многом определяет процессы ангиогенеза, инвазии трофобласта, ремоделирования спиральных артерий с образованием маточно-плацентарных сосудов, повышение эффективности ВРТ зависит от успехов в области изучения механизмов, обеспечивающих гомеостаз на уровне микроциркуляции [3].

**Цель:** оценить функциональное состояние эндотелия и особенности регуляции ангиогенеза

в первом триместре беременности, наступившей в результате ЭКО и ПЭ.

**Пациенты и методы.** Проведено клинико-лабораторное обследование 48 женщин с одноплодной беременностью, наступившей в результате «базовой» процедуры ЭКО и ПЭ (основная группа). Группу сравнения составили 30 женщин с одноплодной беременностью, наступившей спонтанно. Контролируемая овариальная стимуляция проводилась по протоколам с антагонистами гонадотропин-рилизинг-гормона (ганиреликс, цетрореликс) в стандартных дозировках. Для стимуляции роста фолликулов применялись рекомбинантные препараты ФСГ (фоллитропин-альфа, фоллитропин-бета). В качестве триггера овуляции использовался хорионический гонадотропин-альфа в дозировке 6500 МЕ. Исследования проводили в первом триместре гестации после подтверждения факта наступления прогрессирующей беременности с помощью УЗИ и определения содержания  $\beta$ -ХГЧ в сыворотке крови. Уровень васкуло-эндотелиального фактора роста (VEGF) и его растворимого рецептора-1 (sVEGF-R1) определяли с помощью коммерческих тест-систем «Bender Medsystems» (Австрия), концентрацию

эндоглина – с использованием реагентов фирмы «R&D Systems» (США), содержание эндотелина-1 – с помощью наборов фирмы «Biomedica» (Австрия) методом ИФА. Уровень стабильных метаболитов оксида азота (NO) (эндогенного нитрита, общего нитрита и нитрата) оценивали спектрофотометрическим методом с помощью тест-систем «R&D Systems» (США). Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета прикладных программ «Statistica for Windows 6.0». Данные представляли в виде медианы (Me), нижнего и верхнего квартилей (P25-P75). Проверку статистических гипотез об отсутствии межгрупповых различий осуществляли с помощью непараметрического U-критерия Манна-Уитни, уровень значимости различий принимали  $p < 0,05$ .

**Основные результаты.** Женщины, включенные в исследование, были сопоставимы по возрасту (26-40 лет), структуре и частоте встречаемости хронических заболеваний, являлись жительницами Екатеринбурга и Свердловской области. Установлено, что при беременности, индуцированной ВРТ, уровень эндотелина-1 был в 2,7 раза выше, чем при беременности, наступившей спонтанно (1,82 (0,73–3,19) фмоль/мл против 0,67 (0,14–2,63) фмоль/мл,  $p = 0,04$ ).

Содержание общего NO<sub>2</sub> в основной группе также было статистически значительно выше аналогичного показателя у группы сравнения (16,38 (14,23–21,83) мкмоль/л против 14,93 (9,87–18,84) мкмоль/л,  $p = 0,03$ ), уровень эндогенного NO<sub>2</sub> превышал таковой при спонтанной беременности в 1,8 раза (1,66 (1,09–2,34) мкмоль/л против 0,94 (0,48–1,58) мкмоль/л,  $p = 0,001$ ).

Повышение продукции одного из основных вазоконстрикторов, сопровождающееся, очевидно, компенсаторным увеличением высвобождения вазодилататоров, установленное в ранние сроки индуцированной беременности, свидетельствует о нарушении функционального состояния эндотелия в условиях надфизиологической гормональной поддержки беременности, наступившей в программах ЭКО и ПЭ. Оценка продукции основных регуляторов ангиогенеза показала, что в группе женщин с индуцированной беременностью содержание проангиогенного VEGF было на порядок ниже, чем в группе сравнения (0,12 (0,0–7,29) пг/мл против 5,16 (2,95–11,05) пг/мл,  $p = 0,04$ ). Уровень противангиогенных фак-

торов эндоглина и растворимого рецептора к VEGF также был снижен в 1,4 и 1,9 раза, соответственно, однако статистически значимые межгрупповые различия были выявлены только в содержании эндоглина (5,31 (4,61–6,19) нг/мл против 7,66 (6,36–10,08) нг/мл,  $p < 0,001$  и 0,54 (0,06–1,29) пг/мл против 1,01 (0,71–1,87) пг/мл,  $p = 0,09$ ).

В связи с тем, что эндотелий принимает непосредственное участие в поддержании сосудистого гомеостаза, а также в процессах васкуляризации при становлении фетоплацентарного кровообращения, дисфункция эндотелия может обуславливать неполноценность ангиогенеза, внося существенный вклад в нарушение продукции факторов роста на этапе плацентации, а, также, не обеспечивая адекватного ответа на выработку ангиогенных факторов другими источниками, прежде всего, трофобластом, что расценивается, как несостоятельность точки приложения индукторов васкуляризации. Нарушение формирования сосудистой сети плаценты является одной из основных причин, приводящих к реализации патологических состояний. В связи с этим увеличение частоты встречаемости гестационных осложнений и невынашивания при индуцированной беременности может быть связано с эндотелиопатией, которая обуславливает нарушение регуляции ангиогенеза и реализацию патологических состояний, опосредованных сосудистым компонентом.

**Заключение.** Первый триместр беременности, индуцированной ВРТ, характеризуется повышением содержания эндотелина-1, общего и эндогенного нитрита на фоне снижения уровня как про- (VEGF), так и антиангиогенных (эндоглин) факторов. Таким образом, нарушение функционального состояния эндотелия в условиях гормональной стимуляции и поддержки беременности в программах ЭКО и ПЭ сопровождается дисрегуляцией процессов ангиогенеза.

Работа поддержана Грантом РФФИ и РФФИ-Урал № 13-04-96080.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Комилова М. С., Пахомова Ж. Е. Российский вестник акушера-гинеколога. 2015. № 1. С. 18-23.
2. Литневская М. А. Трудный пациент. 2014. Т. 12, № 8–9. С. 17-21.
3. Невзорова И. А., Егорова А. Т., Салмина А. Б., Жирова Н. В. Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии. 2014. Т. 13, № 6. С. 49-53.

## THE CHARACTERISTICS OF THE ENDOTHELIAL FUNCTION AND ANGIOGENESIS REGULATION IN THE FIRST TRIMESTER OF PREGNANCY RESULTING FROM ASSISTED REPRODUCTIVE TECHNOLOGIES

Chistyakova G. N., Gazieva I. A., Tsyvian P. B., Kozjekina Y. N.

*Mother and Child Care Ural Research Institution of Russia Public Health Ministry,  
Yekaterinburg, Russia*

To evaluate the endothelial function and the specific features of angiogenesis regulation in the first trimester of singleton pregnancy induced by assisted reproductive technologies (ART) there were surveyed 48 women with pregnancy resulting from in vitro fertilization and embryo transfer and 30 women with spontaneous singleton pregnancy. It is established that the first trimester of ART-induced pregnancy is characterized by the increased levels of endothelin-1, total and endogenous nitrite against a decrease in the level of proangiogenic (VEGF) and antiangiogenic (endoglin) factors. Thus, the endothelial dysfunction by supraphysiological hormonal support of pregnancy in ART programs is accompanied by a dysregulation of angiogenesis that could be the cause of gestational complications in future.

---

---

## ПНЕВМОПРОТЕИНЫ ПРИ ВРОЖДЕННОЙ ПНЕВМОНИИ И РДС

Шилова Н. А., Чаша Т. В., Кузьменко Г. Н.,  
Хорошилова А. Г.

*ФГБУ «Ивановский НИИ материнства и детства им. В. Н. Городкова»  
Минздрава России, Иваново, Россия*

Содержание сурфактантного протеина D и белка клеток Клара у глубоконедоношенных новорожденных в бронхо-альвеолярной жидкости и сыворотке крови выше у пациентов с врожденной пневмонией, чем у детей с РДС. Низкое содержание этих белков у детей с пневмонией было связано с последующим развитием бронхолегочной дисплазии.

*Ключевые слова:* респираторный дистресс (РДС), сурфактантный протеин D (СПД), недоношенные новорожденные.

**Актуальность:** в структуре неонатальной смертности у глубоконедоношенных новорожденных остается высоким удельный вес дыхательных расстройств (в т.ч. врожденной пневмонии и респираторного дистресс синдрома (РДС) [1]. Необходим поиск новых маркеров для ранней диагностики, что позволит улучшить результаты лечения. В последнее время большое внимание уделяется изучению роли пневмопротеинов, которые являются специфическими белками эпителия легкого (сурфактантный протеин D и белок клеток Клара). Сурфактантный протеин D (СПД) – это один из белков сурфактанта, роль которого заключается в антиинфекционной защите

легких [2]. Белок клеток Клара (БКК) секретируется клетками Клара терминальных бронхиол и играет важную иммуносупрессивную и противовоспалительную роль в легких [3].

**Цель:** определить содержание пневмопротеинов у глубоконедоношенных новорожденных с врожденной пневмонией и РДС.

**Материалы и методы исследования.** Проведено обследование 106 новорожденных гестационным возрастом менее 32 недели с очень низкой и экстремально низкой массой тела при рождении. Выделены 2 группы наблюдения. 1-я группа – 41 ребенок с РДС. 2-я группа – 65 детей с врожденной пневмонией. Содержание СПД и БКК определяли

в бронхоальвеолярной лаважной жидкости и сыворотке крови.

**Результаты и их обсуждение:** Содержание как СПД, так и БКК в бронхоальвеолярной лаважной жидкости у детей с врожденной пневмонией оказалось значительно выше, чем у новорожденных с РДС. Полученные данные свидетельствуют об активации местного противоинфекционного легочного иммунитета с усиленным синтезом СПД и БКК в ответ на воздействие микробных агентов и развитие воспаления в легких, что имеет защитный характер.

Уровень СПД и БКК в сыворотке крови у недоношенных новорожденных с врожденной пневмонией был также значительно выше, чем у детей с РДС. Необходимо отметить, что синтез и элиминация СПД происходит в легких и в норме этот белок в системном кровотоке не определяется. Поэтому повышение уровня СПД в сыворотке крови у детей с пневмонией, на наш взгляд, можно объяснить более выраженным сочетанным повреждением альвеолярно-капиллярного барьера, повышением его порозности и выходом СПД в кровеносное русло у новорожденных с врожденной пневмонией.

БКК синтезируется в легких, проходит через альвеолярно-капиллярный барьер, попадает в системный кровоток и элиминируется почками. По экспериментальным данным (у животных и у взрослых) доказано, что при повреждении легкого сначала пролиферативная активность клеток Клара резко возрастает, что носит защитный характер, а затем при продолжающемся длительном воздействии патологического фактора происходит их истощение и гибель. Не исключено, что такой же

механизм имеет место у новорожденных детей. Т.е. повышение БКК у детей с пневмонией в раннем неонатальном периоде носит защитный характер.

В исходе перенесенной пневмонии у 12 новорожденных развилась бронхолегочная дисплазия (БЛД). Оценка содержания пневмопротеинов показала, что уровень СПД и БКК у этих детей на 3-и сутки жизни был значительно ниже как в лаважной жидкости (в 2,4 раза), так и в сыворотке крови (в 2,7 раза), чем у пациентов, выздоровевших от пневмонии. Полученные данные можно объяснить неспособностью клеток респираторного эпителия у детей с развившейся БЛД к синтезу СПД и БКК в количестве, необходимом для антиинфекционной защиты легких, а также для предотвращения разрастания соединительной ткани в процессе репарации легочной паренхимы. Это, вероятно, обусловлено их повреждением еще на антенатальном этапе.

**Выводы:** установленные особенности содержания пневмопротеинов в бронхоальвеолярной лаважной жидкости и сыворотке крови могут быть использованы для проведения дифференциального диагноза врожденной пневмонии и РДС у новорожденных с очень низкой и экстремально низкой массой тела при рождении, а также для прогнозирования БЛД.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кулаков В. И., Антонов А. Г., Байбарина Е. Н. Рос. вестн. перинатологии и педиатрии. – 2006. – № 4. – С. 8–11.
2. Dahl M., Holmskov U., Husby S. et al. *Pediatr Res.* 2006 Jun; 59 (6):806-10.
3. Schrama A. J., Bernard A., Poorthuis B. J. et al. *Eur J Pediatr.* 2008 Nov; 167 (11): 1305-12.

## PNEUMOPROTEINS IN CONGENITAL PNEUMONIA

Shilova N. A., Chasha T. V., Kuzmenko G. N., Horoshilova A. G.

*V. N. Gorodkov Federal State Research Institute of Maternity and Childhood, Ivanovo, Russia*

Concentrations of the surfactant protein D and Clara cell protein in very preterm newborn in the blood and alveolar lavage fluid were found to be significantly higher in patients with congenital pneumonia than in infants with respiratory distress syndrome. The low content of these proteins in infants with congenital pneumonia was associated with the subsequent development of bronchopulmonary dysplasia.



## ЛОКАЛЬНЫЙ УРОВЕНЬ БЕЛКОВ ОСТРОЙ ФАЗЫ У ЖЕНЩИН С ЭКТОПИЕЙ ШЕЙКИ МАТКИ

Янгиева Г. Б., Каттаходжаева М. Х.

Ташкентская медицинская академия, Ташкент, Узбекистан

Обследовали 80 женщин репродуктивного возраста с эктопией шейки матки. Изучали неспецифические факторы защиты в цервикальном секрете – уровень компонента комплемента С3 и лактоферрина. Было выявлено, что при эктопии шейки матки уровень С3 и лактоферрина повышаются. У женщин с эктопией шейки матки на фоне ПВИ эти изменения более глубокие.

*Ключевые слова:* эктопия, папиллома вирусная инфекция, белки острой фазы.

Несмотря на то, что история изучения эктопии шейки матки (ЭШМ) насчитывает уже вековую историю, в последние десятилетия эта проблема привлекает все большее внимание. Вызывает озабоченность широкое распространение этой патологии, которая встречается у 10–15% молодых женщин и девушек-подростков, и ее негативное влияние на репродуктивное здоровье [1]. Прогрессирование цервикальных интраэпителиальных неоплазий зависит от ряда факторов, решающим из которых является состояние местного иммунитета [2]. Как известно, шейка матки и влагалище относятся к органам, находящимся на границе внутренней среды организма женщины с агрессивной внешней средой. Кроме анатомических особенностей, обеспечивающих защиту внутренней среды организма женщины, шейка матки обладает автономной иммунной системой, представленной местным и гуморальным иммунитетом [3,4]. Патологическое состояние шейки матки сопровождается дисбалансом иммунологических параметров.

**Целью** исследования явилось изучение локального уровня С3 компонента комплемента и лактоферрина у женщин с эктопией шейки матки.

**Материалы и методы исследования.** Были комплексно обследованы 80 женщин с ЭШМ в возрасте от 18 лет до 41 года. Контрольную группу составили 30 здоровых женщин того же возраста. Было проведено обследование женщин с учетом анамнеза, лабораторных исследований, клинических проявлений заболевания, гинекологического осмотра, кольпоскопических исследований.

Иммунологические исследования проводили при изучении уровня С3 и лактоферрина в цервикальном секрете методом ИФА.

Статистическую обработку материала проводили на компьютере с помощью лицензированных программных систем. Вычисляли основные статистические показатели ( $M \pm m$ ). Для анализа различий применяли *t*-критерий Стьюдента.

**Результаты и их обсуждение.** Проведенные нами исследования показали, что наиболее частыми жалобами пациенток с цервикальной эктопией были бели – 64,0% преимущественно слизисто-молочного характера, дискомфорт в области наружных половых органов – 55,2%, периодические боли внизу живота и зуд наружных половых органов у 48,6% и 36,8%. У 20,0% больных регистрировалось бессимптомное течение. Наиболее частыми топическими диагнозами при цервикальной эктопии, явились кондиломатоз вульвы и/или влагалища, хронический сальпингоофорит и хронический цервицит. Инфицированность генитального тракта ВПЧ по результатам ПЦР составил 75,0%, ВПГ и ЦМВ по результатам обнаружения специфических в цервикальном секрете – 66,7% и 54,4%, хламидийной инфекцией по результатам ПЦР – 16,1%, микоплазменной инфекцией (*M. genitalium*) – 26,5%. Частота обнаружения условно-патогенной микрофлоры у больных с цервикальной эктопией, составила 61,1%.

Лактоферрин представляет собой железосвязывающий гликопротеин, выступающий протектором тканей от повреждающего действия гидроксильных радикалов. Он опосредует реакции поверхностного натяжения

на клеточных мембранах и силы отталкивания между ними [3]. Биологическая роль этого эффекта заключается в удержании нейтрофилов в воспалительном очаге. Проведенные нами исследования показали, что в цервикальном секрете у женщин, составивших контрольную группу, уровень лактоферрина составил в среднем  $187,6 \pm 15,6$  Нг/мл. У женщин с эктопией шейки матки уровень данного белка острой фазы был в пределах от 210 до 500 Нг/мл, составляя в среднем  $430,1 \pm 25,8$  Нг/мл, что более чем в 2 раза выше значений контрольной группы ( $P < 0,01$ ). Уровень лактоферрина у женщин с эктопией на фоне вирусной нагрузки был выше в 3,2 раза –  $593,7 \pm 32,4$  Нг/мл, чем у женщин контрольной группы ( $P < 0,001$ ) и в 1,4 раза выше, чем у женщин без инфекции ( $P < 0,05$ ).

Высокая концентрация ЛФ, возможно, влияет на смену клеточных фаз в очаге острого воспаления, замедляя смену полиморфноядерных лейкоцитов популяцией моноцитов – макрофагов. По мнению ряда исследователей, ЛФ является высокочувствительным маркером любого воспалительного процесса [3].

Изучение уровня компонента комплемента С3 показало, что у женщин с эктопией на фоне инфекций наблюдается его повышение в 1,8 раза по сравнению с данными контрольной группы ( $13,1 \pm 0,8$  мг/мл против  $7,3 \pm 0,3$  мг/мл в контроле) ( $P < 0,01$ ), в то время, как у женщин с эктопией без инфекции уровень С3 был повышенным в 1,2 раза по сравнению с данными контрольной группы ( $8,76 \pm 0,5$  мг/мл) ( $P < 0,05$ ).

Комплемент, как известно, это сложный комплекс белков, которые формируют каскадные системы усиленного ответа на антиген [4]. В наибольшей концентрации в сыворотке крови присутствует компонент комплемента С3. Повышение уровня С3 свидетельствует о том, что в данном случае ответные и компенсаторные реакции на хроническую вирусную ин-

токсикацию имеют широкий спектр и амплитуду. Это позволяет классифицировать общее состояние иммунной адаптации как иммунопатологическое. Возможно, что эта длительная и стойкая активация, в особенности систем неспецифической защиты, приводящая к включению не только основных, но и резервных приспособительных реакций в механизмах саморегуляции иммунного гомеостаза, и составляет главную сущность вторичных иммунодефицитов.

Проведенное исследование показало, что при эктопии шейки матки, осложненной инфекцией в органах, содержание С3 повышалось. Поскольку компонент комплемента С3 является важным фактором защиты эпителиальной ткани, некоторое повышение его уровня, вероятно, и обеспечивает надежную защиту тканей от деструктивного воздействия воспалительных агентов [4]. Однако резкое повышение уровня С3 при инфекционной нагрузке свидетельствует о снижении резистентности организма. Полученные результаты исследования содержания лактоферрина при эктопии шейки матки не противоречат данным отечественной и зарубежной литературы о повышении его концентрации при других воспалительных процессах.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Прилепская В. Н., Рудакова Е. Б., Кононов А. В. Эктопии и эрозии шейки матки. М: МЕДпресс 2002; 175.
2. Костава М. Н. Поликлиническая гинекология. М. 2004. С. 48-53.
3. Юркина Э. А., Жевачевский Н. Г., Гребенщиков Л. В. и др. Научная конференция “Проблемы инфекционной патологии в регионах Сибири, Дальнего Востока и Крайнего Севера”: Тезисы. Новосибирск 1998; 210-211.
4. Кудрявцев И. В., Полевщиков А. В. Цитокины и воспаление. 2005. Т. 4, № 1. С. 11-21.

### THE LOCAL LEVEL OF ACUTE PHASE PROTEINS IN WOMEN WITH CERVICAL ECTOPIES

Yangieva G. B., Kattahodzhaeva M. Kh.

Tashkent Medical Academy, Tashkent, Uzbekistan

The study included 80 women of reproductive age with ectopia of the cervix. Nonspecific protective factors in cervical secretions – the level of complement component C3 and lactoferrin were studied. It was found that ectopic cervical level of C3 and lactoferrin increased. In women with cervical ectopia against the background of PVI these changes are more profound.

*Key words: ectopia, papilloma virus infection, acute phase proteins*

**Раздел 6**  
**АУТОИММУНИТЕТ**

## СОДЕРЖАНИЕ ГИСТОНОВЫХ БЕЛКОВ В ЛИМФОЦИТАХ КРОВИ И ПРОЯВЛЕНИЕ ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ПРОЦЕССА

Гетте И. Ф.<sup>1,3</sup>, Данилова И. Г.<sup>2,3</sup>, Остроушко А. А.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>ФГБУН Институт иммунологии и физиологии УрО РАН; <sup>2</sup>ГУЗ СО Институт медицинских клеточных технологий; <sup>3</sup>ФГАОУ ВПО Уральский федеральный университет, Екатеринбург, Россия

Проведено исследование содержания гистоновых белков в лимфоцитах крови на двух экспериментальных моделях: аллоксановый диабет и 30-дневная экспозиция наночастиц (железо-молибденовых букиболов). Было установлено, что при наличии воспалительного процесса и увеличения количества лейкоцитов и лимфоцитов в крови происходило снижение общего количества гистоновых белков и их фракции Н2А, Н3, Н4 в лимфоцитах.

*Ключевые слова:* гистоновые белки, лимфоциты, аллоксановый диабет, наночастицы.

Заболевания, в патогенезе которых имеют место воспалительные реакции, часто характеризуются длительным течением. Существует предположение, что сохранение провоспалительного фенотипа лимфоцитов, ответственных за продолжительную агрессию в отношении различных тканей, обусловлено модификацией и, возможно, количеством гистоновых белков, определяющих эпигенетическую регуляцию генов провоспалительных факторов [1, 5]. Однако данные о содержании гистоновых белков в лимфоцитах крови при патологических процессах, сопровождающихся воспалительными реакциями, противоречивы и требуют дальнейшего исследования.

**Цель работы** – определить содержание гистоновых белков и их фракций в лимфоцитах крови на экспериментальных моделях с различной выраженностью воспалительного процесса (аллоксановом диабете и действии железо-молибденовых букиболов).

**Материалы и методы.** Опыты выполнены на 30 беспородных крысах-самцах массой 200–230 г в соответствии с рекомендациями международных этических комитетов (Директива Совета ЕС 2010/63/EU). Животные были разделены на 3 группы по 10 крыс в каждой: 1 – интактные; 2 – модель аллоксанового диабета, выполненная по авторской методике [2];

3 – внутримышечные инъекции наночастиц – железо-молибденовых букиболов в количестве 0,15 мг/100г в течение 30 дней.

Для определения содержания глюкозы использовали наборы реактивов Витал-диагностикс (С-Пб), гликозилированного гемоглобина (HbA1c) – «Диабет-тест» ФОСФОСОРБ. Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре СФ-56. Содержание инсулина в крови определяли по наборам Elisa (UK) на анализаторе Adaltis (Italy). Анализ периферической крови проводили на гематологическом анализаторе Celly 70 Biocode Hysel. В лимфоцитах, выделенных из крови центрифугированием в смеси фиколл-верографин, определяли содержание фракций гистоновых белков методом Маркушевой Л.И. и соавторов, 2000 г [3] и выражали в мкг/млн. лимфоцитов. Статистический анализ материала проводили с помощью программ Statistica 6.0 (Stat. Soft.Inc.), программы Microsoft Exel 2003 и непараметрического критерия Манна–Уитни. При проверке статистических гипотез использовался уровень значимости 5% ( $P < 0,05$ ).

**Результаты и обсуждение.** В 1 группе крыс моделирование аллоксанового диабета, соответствующего декомпенсированной форме сахарного диабета 1 типа, подтверждалось увеличением уровня глюкозы с  $5,8 \pm$

0,2 ммоль/л до  $27,6 \pm 2,7$  ммоль/л, HbA1C с  $3,9 \pm 0,2\%$  до  $9,6 \pm 0,3\%$  и снижением инсулина с  $1,21 \pm 0,2$  мкг/л до  $0,45 \pm 0,09$  мкг/л. О наличии воспалительного процесса у крыс с аллоксановым диабетом свидетельствовало увеличение общего количества лейкоцитов с  $13,4 \pm 0,8$  тыс./мкл до  $24,1 \pm 0,8$  тыс./мкл и фракции лимфоцитов (с  $10,7 \pm 0,7$  тыс./мкл до  $18,5 \pm 2,1$  тыс./мкл), а также формирование инсулита, ранее подтвержденное морфологическими методами [4].

Действие наноматериалов на клеточном уровне может сопровождаться иммунными и воспалительными реакциями, направленными на утилизацию белков, подвергшихся действию наночастиц. В то же время во второй группе крыс с 30-дневной экспозицией железо-молибденовых бубкиолов общее количество лейкоцитов и лимфоцитов не отличалось достоверно от показателей интактных животных и составляло соответственно  $9,3 \pm 1,7$  тыс./мкл, а лимфоцитов  $6,2 \pm 1,1$  тыс./мкл, что свидетельствует об отсутствии воспалительного процесса на уровне всего организма. В обеих опытных группах не обнаружено отклонений от нормы других показателей лейкоцитарной формулы.

У животных с аллоксановым диабетом по сравнению с интактными крысами установлено достоверное уменьшение ( $P < 0,05$ ) общего количества гистоновых белков (с  $37,5 \pm 1,2$  мкг/млн. до  $20,1 \pm 4,8$  мкг/млн) за счет фракции H2A, H3, H4 (с  $24,6 \pm 0,8$  мкг/млн. до  $10,1 \pm 1,3$  мкг/млн). Со-

гласно данным литературы удаление от ДНК именно H3-фракции гистонов связано с усилением синтеза провоспалительных факторов TNF- $\alpha$  и IL-1 $\beta$  у больных сахарным диабетом и другими аутоиммунными заболеваниями [5]. Действие железо-молибденовых бубкиолов не сопровождалось достоверным изменением ни общего количества гистонов ( $49,4 \pm 5,3$  мкг/млн), ни фракций H2A, H3, H4 ( $21,1 \pm 2,7$  мкг/мл) и H2B относительно контроля.

Таким образом, выявленные изменения общего количества гистоновых белков и их фракции H2A, H3, H4 в лимфоцитах крови соответствовали общему количеству лейкоцитов крови и лимфоцитарной фракции, характеризующих выраженность процесса воспаления.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гетте И. Ф. Вестник Уральской медицинской академической науки. 2014. № 3 (49). С.19-20.
2. Данилова И. Г., Гетте И. Ф. Способ моделирования аллоксанового диабета. Патент на изобретение № 2534411; 27.11.2014. Бюл. № 33.
3. Маркушева Л. И., Савина М. И., Решина В. М., Тогузов Р. Т. Клиническая лабораторная диагностика. 2000. № 7. С. 18-20.
4. Медведева С. Ю., Булавинцева Т. С., Данилова И. Г., Гетте И. Ф., Сенцов В. Г. Вестник Уральской академической медицинской науки. 2012. 3 (40). С.30-33.
5. Villeneuve L. M., Reddy M. A., Lanting L. L. et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008. 105 (26). P. 9047-52.

### HISTONE PROTEIN CONTENT IN BLOOD LYMPHOCYTES AND MANIFESTATION OF INFLAMMATORY PROCESS

Gette I. F.<sup>1,3</sup>, Danilova I. G.<sup>2,3</sup>, Ostroushko A. A.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Institute of Immunology and physiology UB RAS; <sup>2</sup>Institute of medical cell technologies;

<sup>3</sup>Ural Federal University, Yekaterinburg, Russia

A study of the of histone protein content in blood lymphocytes was conducted with two experimental models: alloxan diabetes and a 30-day exposure of nanoparticles (iron-molybdenum buckyballs). It has been found that the presence of the inflammatory process and the increase of leukocyte and lymphocyte number in blood were accompanied by a reduction of the total histone protein number and their H2A, H3, H4 fraction in lymphocytes.

*Keywords:* histone proteins, lymphocytes, alloxan diabetes, nanoparticles.

## КОРРЕКЦИЯ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ ПРИ АЛЛОКСАНОВОМ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ ПРОИЗВОДНЫМИ 1,3,4-ТИАДИАЗИНА

Емельянов В. В.<sup>1</sup>, Саватеева Е. А.<sup>1</sup>, Сидорова Л. П.<sup>1</sup>, Цейтлер Т. А.<sup>1</sup>,  
Булавинцева Т. С.<sup>2</sup>, Гетте И. Ф.<sup>2</sup>, Данилова И. Г.<sup>2</sup>, Максимова Н. Е.<sup>1</sup>,  
Мочульская Н. Н.<sup>1</sup>, Чупахин О. Н.<sup>1</sup>, Черешнев В. А.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ФГАОУ ВПО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б. Н. Ельцина»; <sup>2</sup>Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, Екатеринбург, Россия

В проведенном исследовании впервые показана способность синтетических серосодержащих гетероциклических соединений ряда 1,3,4-тиадиазина частично корригировать метаболические нарушения при развитии аллоксанового СД у крыс. Соединения снижают выраженность гипергликемии у крыс, накопление гликозилированных белков в их крови и в органах, а также оказывают антиоксидантное действие.

*Ключевые слова:* сахарный диабет, 1,3,4-тиадиазины, оксидативный стресс, неферментативное гликозилирование белков.

Ведущую роль в формировании диабетического поражения сосудов и нервов играет вызванная длительной гипергликемией активация неферментативного гликозилирования белков (НГБ) и оксидативный стресс [1]. Однако в клинической практике недостаточно средств, корригирующих эти два патогенетических механизма. В разработке новых лекарственных средств для лечения сахарного диабета (СД) широко применяется моделирование данной патологии в эксперименте на животных. Ранее нами была выявлена способность гетероциклических соединений ряда 1,3,4-тиадиазина ингибировать реакцию НГБ и проявлять антиоксидантную активность в модельной системе [2]. Целью настоящей работы стала оценка способности производных 1,3,4-тиадиазина корригировать метаболические нарушения при экспериментальном СД.

Эксперимент был проведен на 45 белых беспородных крысах-самцах массой 200–250 г. Животные содержались в условиях лабораторного вивария, где поддерживалась постоянная температура в пределах 22–25°C и естественная смена дня и ночи,

имели свободный доступ к пище и воде. Все манипуляции с животными осуществлялись с соблюдением этических принципов и в соответствии с Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и Совета от 22 сентября 2010 года по охране животных, используемых в научных целях.

Аллоксановый СД моделировали путем трехкратного внутривентриального введения аллоксана в суммарной дозе 300 мг/кг массы животного [3]. Одновременно с индукцией СД начинали введение одного из представителей класса 5-арил-1,3,4-тиадиазин-2-аминов – соединений L-14, L-17, L-31, L-91, H-32, гидробромидов, в дозе 40 мг/кг массы животного (внутримышечно) с периодичностью 3 раза в неделю в течение 4-х недель. Вещества предварительно растворяли в инъекционной воде. По окончании эксперимента в плазме крови животных определяли концентрации глюкозы и общего белка. Для характеристики активности НГБ, у животных определяли концентрацию фруктозамина (ФА) плазмы и гликозилированного гемоглобина (HbA<sub>1c</sub>) крови, а также концентрацию ФА в приготовленных гомогенатах почки и печени. Состояние окси-

дательного стресса оценивали по концентрации малонового диальдегида (МДА) плазмы и активности каталазы цельной крови. Статистическая обработка результатов эксперимента проводилась с применением программного комплекса Biostatistica и MS Excel. Для сравнения двух независимых групп по количественному признаку использован непараметрический критерий Манна-Уитни. Различия между показателями считались статистически значимыми, если уровень значимости  $p$  не превышал 0,05.

Введение аллоксана приводило к выраженной гипергликемии, накоплению гликозилированных белков в крови и органах животных. Так, концентрация глюкозы в крови крыс составила  $34,6 \pm 3,4$  ммоль/л, что в 6–7 раз превышает норму, а  $HbA_{1c}$   $9,1 \pm 0,8\%$ , что превышает норму в 1,5 раза. Гипергликемия служила триггером оксидативного стресса, накопления МДА и снижения активности каталазы крови.

Исследованные синтетические серосодержащие гетероциклические соединения обладали способностью частично корректировать метаболические нарушения при развитии аллоксанового СД. Ключевым моментом корректирующего действия производных 1,3,4-тиадиазина был антигипергликемический эффект. Выраженность этого эффекта для производных 1,3,4-тиадиазина в эксперименте убывала в ряду L-31 > L-91 > L-17 > H-32 > L-14, концентрация глюкозы крови при введении данных соединений составила  $10,3 \pm 0,9$ ,  $13,7 \pm 1,9$ ,  $23,7 \pm 2,2$ ,  $25,2 \pm 5,2$ ,  $29,3 \pm 3,0$  ммоль/л, соответственно ( $p < 0,05$ ). Концентрация  $HbA_{1c}$  также статистически значимо снижалась и составила от  $5,3 \pm 0,3$  до  $7,5 \pm 0,7\%$  ( $p < 0,05$ ).

Показательно, что соединения L-31 и L-91, наиболее активно снижавшие гипергликемию, также увеличивали активность каталазы (до  $1025 \pm 87$  и  $1222 \pm 70$ , соответственно, против  $156 \pm 11$  мккатал/г гемоглобина в контроле), в то время как другие производные 1,3,4-тиадиазина этой способностью не обладали. Это может быть результатом предотвращения инактивации каталазы в результате неферментативного гликозилирования при коррекции гипергликемии данными соединениями [1, 4]. Статистически значимое

снижение концентрации МДА плазмы было достигнуто при применении соединений L-91 ( $303 \pm 43$  мкмоль/л) и L-17 ( $106 \pm 27$  мкмоль/л) по сравнению с  $441 \pm 19$  мкмоль/л в контроле ( $p < 0,05$ ).

Производные 1,3,4-тиадиазина L-17, L-91, H-32, L-14 вызывали снижение концентрации ФА в гомогенатах почки (от  $15,6 \pm 2,2$  до  $23,9 \pm 2,0$  против  $45,2 \pm 3,8$  мкмоль/г белка в контроле,  $p < 0,05$ ) и печени (от  $5,1 \pm 0,9$  до  $9,5 \pm 2,5$  против  $20,9 \pm 8,0$  мкмоль/г белка в контроле,  $p < 0,05$ ). Соединение L-31 отличалось от других 1,3,4-тиадиазинов тем, что не снижало накопления ФА в почках.

Выявленную способность исследованных соединений ослаблять метаболические нарушения при аллоксановом СД мы связываем со способностью 1,3,4-тиадиазинов трансформироваться в тиольные производные [5]. Тиолы, в свою очередь, могут выступать в роли блокаторов НГБ и антиоксидантов в крови и органах животных, а также защищать  $\beta$ -клетки островков Лангерганса от гибели в условиях индуцированного аллоксаном оксидативного стресса [1, 3].

Таким образом, в проведенном исследовании впервые показана способность синтетических серосодержащих гетероциклических соединений ряда 1,3,4-тиадиазина корректировать метаболические нарушения при развитии аллоксанового СД у крыс.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Емельянов В. В., Максимова Н. Е., Мочульская Н. Н., Черешнев В. А. // *Вопр. биол., мед. и фарм. химии.* – 2010. – № 1. – С. 3–15.
2. Емельянов В. В., Саватеева Е. А., Мусальникова А. В. и др. // *Материалы Всероссийской научно-практической конференции биохимиков и специалистов по лабораторной медицине «Медицинская биохимия и клиническая лабораторная диагностика в аспекте модернизации системы научных исследований».* Омск: Издательство ОмГМА, 2011. – С. 89–92.
3. Медведева С. Ю., Булавинцева Т. С., Данилова И. Г. и др. // *Вестник Уральской мед. акад. науки.* – 2012. – № 3. – С. 30–33.
4. Bakala H., Hamelin M., Mary J. et al. // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2012. – V. 1822. – P. 1527–1534.
5. Перова Н. М., Егорова Л. Г., Сидорова Л. П. и др. // *Журнал орг. химии.* – 1994. – Т. 30, Вып. 10. – С. 1560–1565.

## CORRECTION OF METABOLIC DISORDERS IN ALLOXAN DIABETES MELLITUS WITH 1,3,4-THIADIAZINE DERIVATIVES

Emelyanov V. V.<sup>1</sup>, Savateeva E. A.<sup>1</sup>, Sidorova L. P.<sup>1</sup>, Tseitler T. A.<sup>1</sup>,  
Bulavintseva T. S.<sup>2</sup>, Gette I. F.<sup>2</sup>, Danilova I. G.<sup>2</sup>, Maksimova N. E.<sup>1</sup>,  
Mochulskaya N. N.<sup>1</sup>, Chupakhin O. N.<sup>1</sup>, Chereshnev V. A.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Professional Education «Ural Federal University named after the first President of Russia B. N. Yeltsin»; <sup>2</sup>Institute of Immunology and Physiology of UB RAS, Yekaterinburg, Russia

The conducted study demonstrates for the first time the ability of synthetic sulfur-containing heterocyclic compounds of 1,3,4-thiadiazine class to partly correct metabolic disorders during the development of alloxan diabetes mellitus in rats. The compounds reduce the severity of hyperglycemia, accumulation of glycosylated proteins in blood and organs, and have an antioxidant effect.

*Key words:* diabetes mellitus, 1,3,4-thiadiazines, oxidative stress, nonenzymatic protein glycation.

## УРОВНИ ЦИТОКИНОВ В КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С РЕАКТИВНЫМ АРТРИТОМ В ЗАВИМОСТИ ОТ ДЛИТЕЛЬНОСТИ ТЕЧЕНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЯ

Журавлева М. О., Филиппова Ю. В.

ГБОУ ВПО «Оренбургский государственный медицинский университет»  
Минздрава России, Оренбург, Россия

Проведен анализ концентраций ключевых про- и противовоспалительных цитокинов (ФНО- $\alpha$ , ИЛ-6, ИЛ-8, ИФН- $\gamma$  и ИЛ-4, ИЛ-10), а также ЦИК и Ig класса А, М, G в сыворотке крови у 150 больных реактивным артритом (РеА) в зависимости от длительности течения. Установлено статистически высокозначимое превышение содержания в крови провоспалительных (ФНО- $\alpha$ , ИФН- $\gamma$ , ИЛ-8) и противовоспалительных цитокинов (ИЛ-4, ИЛ-10), а также достоверное снижение уровня ИЛ-6 по сравнению со здоровыми лицами. Повышалось содержание ЦИК, IgA и IgM, что приводило к индукции иммуновоспалительного процесса. Отмечается дисбаланс цитокинов и зависимость их концентраций от длительности течения РеА.

*Ключевые слова:* реактивный артрит, цитокины.

В последнее время увеличилась частота возникновения реактивных артритов (РеА), которая составляет 10–41% всех ревматических болезней [1]. Чаще всего РеА страдают лица молодого и зрелого возраста, у которых он склонен к рецидивированию [2], хронизации, что может приводить к инвалидизации больных, в связи с чем изучение данного заболевания актуально как в медицинском, так и в социальном аспектах. К РеА относят воспалительные негнойные заболевания суставов, развивающиеся вследствие иммунных нару-

шений, после кишечной или урогенитальной инфекции у генетически предрасположенных людей [3].

В основе патогенеза РеА лежит дисбаланс цитокинов. Важную роль в эрадикации инфекционных агентов, особенно в случае с внутриклеточными бактериями, играют провоспалительные цитокины Th1 типа, такие как интерферон гамма (ИФН- $\gamma$ ) и фактор некроза опухоли-альфа (ФНО- $\alpha$ ) [4]. В других исследованиях было показано, что при РеА антибактериальный Th1-иммунный ответ снижен



в пользу Th2-иммунного ответа. Патогенез заболевания до конца не изучен, в связи с чем его лечение недостаточно эффективно.

**Цель работы:** провести анализ концентраций ключевых про- и противовоспалительных цитокинов (ФНО- $\alpha$ , ИЛ-6, ИЛ-8, ИФН- $\gamma$  и ИЛ-4, ИЛ-10), циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) и иммуноглобулинов (Ig) в сыворотке крови у больных РеА в зависимости от длительности течения заболевания.

**Материалы и методы.** Обследовано 150 больных РеА, средний возраст которых составил  $39,7 \pm 12,3$  года, из них 44 мужчин и 106 женщин. Всем было проведено физикальное, лабораторное, рентгенологическое, ультразвуковое, иммунологическое, микробиологическое обследование. Диагноз ставился на основании критериев, принятых на III Международном совещании по РеА в Берлине в 1996 г. Острое течение заболевания наблюдалось у 79 человек (52,6%), хроническое – у 46 (30,71%), затяжное – у 25 (16,7%). Преобладали больные с высокой степенью активности. По DAS28 умеренная активность была у 13 человек (8,6%), высокая – у 112 (74,7%), очень высокая – у 25 (16,7%) и по индексу BASDAI умеренная активность наблюдалась у 15 человек (10,0%), высокая – у 91 (60,7%), очень высокая – у 44 (29,3%). При рентгенологическом исследовании костной патологии периферических суставов в 90% случаев не обнаруживалось. Признаки синовита отмечались при ультразвуковом исследовании у всех обследованных, периартрита более чем у половины. По функциональной недостаточности суставов преобладали пациенты с нарушениями способности к трудовой деятельности, но сохранением способности к самообслуживанию. Определение концентраций ФНО- $\alpha$ , ИФН- $\gamma$ , ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-10 и ИЛ-4 проводилось методом ИФА в сыворотке крови с использованием наборов «Цитокин», ЦИК – методом преципитации с раствором полиэтиленгликоля. Для определения содержания сывороточных иммуноглобулинов классов А, М, G использовали метод радиальной иммунодиффузии в агаровом геле. В качестве контроля использованы параметры 30 здоровых лиц. Статистическую обработку материала выполняли с использованием пакета прикладных программ Statistica 6,0.

**Результаты и обсуждение.** Содержание в сыворотке крови провоспалительных цитокинов оказалось статистически значи-

мо выше у пациентов с РеА по сравнению с контролем. Так, установлено статистически значимое превышение концентрации ФНО- $\alpha$  в сыворотке крови у больных РеА ( $28,86 \pm 0,28$  пг/мл) по сравнению со здоровыми лицами ( $3,81 \pm 0,34$  пг/мл), как «ключевого» цитокина в развитии воспалительной реакции при артрите. Также более высокими ( $p < 0,0001$ ) были концентрации ИЛ-8 и ИФН- $\gamma$  у пациентов с РеА ( $227,12 \pm 2,39$  и  $67,28 \pm 0,64$  пг/мл), чем у здоровых доноров ( $25,34 \pm 3,84$  и  $24,32 \pm 3,37$  пг/мл соответственно). Отмечается увеличение уровней ФНО- $\alpha$  и ИФН- $\gamma$  в зависимости от длительности заболевания. При остром течении РеА концентрация ФНО- $\alpha$  достоверно ниже ( $26,81 \pm 0,32$ ), чем при затяжном и хроническом ( $30,89 \pm 0,32$  пг/мл). Также реагировал и уровень ИФН- $\gamma$ : при остром РеА он составил  $65,21 \pm 0,75$ , а при хроническом –  $78,21 \pm 1,22$  пг/мл. Концентрация ИЛ-8 статистически значимо снижалась при более длительном течении РеА, однако, все равно превышала таковую у здоровых. При остром РеА она составила  $221,34 \pm 2,48$ , при хроническом –  $219,49 \pm 2,75$  пг/мл. В сыворотке уровень ИЛ-6 при остром РеА ( $12,45 \pm 0,52$  пг/мл) практически не отличался от такового у здоровых ( $12,9 \pm 2,5$  пг/мл). Происходит его истощение при хронизации процесса ( $7,74 \pm 0,85$  пг/мл,  $p < 0,0001$ ).

Образовавшиеся в большом количестве ЦИК ( $174,14 \pm 6,34$  ЕД ОП) у пациентов с РеА по сравнению с контролем ( $67,96 \pm 1,1$  ЕД ОП), фиксировались, по-видимому, в тканях сустава, вызывали гиперпродукцию провоспалительных цитокинов, что приводило к индукции иммуновоспалительного процесса. Уровни ЦИК достоверно выше у больных хроническим РеА, по сравнению с острым ( $179,85 \pm 7,64$  и  $98,36 \pm 2,4$  ЕД ОП). Статистически значимо было повышение титров IgA, IgM и IgG в периферической крови при РеА ( $2,77 \pm 0,18$ ,  $2,06 \pm 0,11$  и  $14,57 \pm 0,71$  г/л соответственно) по сравнению со здоровыми ( $1,91 \pm 0,03$ ,  $1,44 \pm 0,04$  и  $12,80 \pm 0,4$  г/л соответственно). Это характерно для данного заболевания и является маркером персистенции триггерных инфекционных факторов, именно IgA выступают в роли аутоантител к различным компонентам тканей макроорганизма [5]. При хроническом течении РеА содержание IgA и IgM достоверно выше, чем при остром ( $2,85 \pm 0,2$ ,  $2,26 \pm 0,77$  и  $2,67 \pm 0,2$ ,  $1,63 \pm 0,1$  г/л

соответственно). Уровень IgG достоверно не изменялся в зависимости от длительности заболевания: при остром он был незначительно больше, чем при хроническом ( $14,59 \pm 0,1$  и  $13,78 \pm 1,3$ ,  $p < 0,2$ ).

Установлены статистически высокосущественные различия между сывороточными концентрациями ИЛ-4 и ИЛ-10 у больных РеА ( $9,84 \pm 0,46$  и  $16,83 \pm 0,22$  пг/мл) и у здоровых лиц ( $3,35 \pm 0,34$  и  $7,70 \pm 0,60$  пг/мл). Гиперпродукция ИЛ-4, вероятно способствует длительной персистенции бактерий в организме человека и в синовиальной оболочке и полости сустава. При этом отмечается достоверное увеличение уровней данных цитокинов в зависимости от длительности течения РеА. При остром процессе содержание ИЛ-4 и ИЛ-10 было  $8,5 \pm 0,62$  и  $15,23 \pm 0,31$  пг/мл, а при хроническом –  $17,24 \pm 0,79$  и  $18,75 \pm 0,37$  пг/мл соответственно, что может способствовать персистенции иммуновоспалительных изменений.

Таким образом, установлена зависимость концентраций цитокинов от длительности течения РеА. При хронизации процесса достоверно увеличивается содержание в крови ФНО- $\alpha$ , ИФН- $\gamma$ , ИЛ-4, ИЛ-10, ЦИК, IgA и IgM и, напротив, снижаются уровни ИЛ-6, ИЛ-8.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Фоломеева О. М., Галушко Е. А., Эрдес Ш. Ф. Научно-практическая ревматология 2008, 4, 4–14.
2. Hannu T et al. Best Pract Res Clin Rheumatol 2006, 20 (3), 419.
3. Kwiatkowska B., Filipowicz-Sosnowska A. Pol Arch Med Wewn 2009, 119 (1–2), 60–5.
4. Chou C. T., Huo A. P., Chang H. N. Arch. Med. Res 2007, 38 (1), 190–195.
5. Журавлева М. О., Лившиц Н. М. Вестник Уральской медицинской академической науки 2012, 41 (4), 111–112.

### THE LEVELS OF CYTOKINES IN THE BLOOD OF PATIENTS WITH REACTIVE ARTHRITIS DEPENDING ON THE TYPE OF DURATION OF DISEASE

Zhuravleva M. O., Filippova Y. V.

*Orenburg State Medical University, Orenburg, Russia*

The analysis of the concentrations of key pro- and anti-inflammatory cytokines (TNF $\alpha$ , IL-6, IL-8, IFN- $\gamma$  and IL-4, IL-10), as well as the CIC and Ig class A, M, G in the serum of 150 patients with reactive arthritis (Rea), depending on the duration was made. Statistically highly significant excess in the blood levels of proinflammatory (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-8) and anti-inflammatory cytokines (IL-4, IL-10), as well as a significant decrease in the level of IL-6 compared with healthy individuals was determined. The content of the CIC, IgA and IgM was increased leading to the induction of immune inflammatory process. It is noted the imbalance of cytokines and their concentration dependence on the ReA duration.

*Keywords:* reactive arthritis, cytokines.

## АНАЛИЗ УРОВНЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ Т-ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ БОЛЬНЫХ РАССЕЯННЫМ СКЛЕРОЗОМ

Кудрявцев И. В.<sup>1,2</sup>, Серебрякова М. К.<sup>1</sup>, Петров А. М.<sup>3</sup>,  
Столяров И. Д.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>ФГБУН «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург; <sup>2</sup>Школа биомедицины Дальневосточного федерального университета, Владивосток; <sup>3</sup>ФГБУН Институт мозга человека им. Н. П. Бехтерева РАН, Санкт-Петербург, Россия

С использованием проточной цитометрии проведен анализ экспрессии CD45RA и CD62L Т-лимфоцитами периферической крови у больных рассеянным склерозом. Снижение в периферической крови Т-клеток и Т-хелперов коррелировало с тяжестью заболевания. Содержание CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> Т-хелперов и цитотоксических Т-клеток падало по мере увеличения баллов по шкале EDSS. Количество CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CD62L<sup>-</sup> возросло у больных РС при сравнении с группой контроля.

**Ключевые слова:** дифференцировка Т-лимфоцитов, рассеянный склероз, проточная цитометрия.

**Актуальность и цель работы.** Т-лимфоциты играют одну из ведущих ролей в патогенезе рассеянного склероза (РС). В настоящее время существует несколько классификаций Т-клеток, которые используются в научных и клинических исследованиях для разделения Т-хелперов и цитотоксических Т-клеток на отдельные субпопуляции, в зависимости от их функциональных способностей [1]. Чаще всего эти построения основаны на оценке уровня экспрессии CD62L или CCR7, отвечающих за миграцию лимфоцитов в Т-зависимые зоны периферических лимфоидных органов, и CD45RA. Т-клетки, экспрессирующие обе эти молекулы на своей поверхности, называются «наивными» (N). Эти клетки прошли только антиген-независимую дифференцировку в тимусе, обладают набором адгезионных молекул и хемокиновых рецепторов, позволяющим им выборочно мигрировать в месте локализации активированных дендритных клеток, и не способны проявлению эффекторных свойств. Потеря CD45RA свидетельствует о том, что Т-лимфоцит прошел антиген-зависимую дифференцировку в периферических лимфоидных органах. Клетки, несущие CD62L или CCR7, получают название Т-клеток центральной памяти (СМ), так как основной их функцией является поддержание долговременной

иммунологической памяти, а повторный контакт с антигеном сопровождается формированием нового клона антиген-специфических клеток. Снижение же экспрессии CD62L позволяет выявить популяцию Т-клеток эффекторной памяти (ЕМ), которые в отличие от СМ мигрируют в периферические ткани, где и проявляют свои эффекторные свойства. Клетки с фенотипом CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup> называются «терминально-дифференцированными» CD45RA-позитивными эффекторными клетками (TEMRA). Они формируют популяцию коротко живущих лимфоцитов с выраженными эффекторными свойствами и сниженной пролиферативной активностью [1].

**Материалы и методы.** С использованием многоцветной проточной цитофлуориметрии в периферической крови больных РС (группа 1 – балл по расширенной шкале инвалидизации (EDSS) <3, n=18; группа 2 – балл EDSS ≥3, n=25) и условно здоровых доноров (группа контроля, n=30) проведен анализ основных популяций Т-лимфоцитов. На основании экспрессии CD45RA и CD62L среди CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> и CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> лимфоцитов выделены «наивные» клетки, клетки центральной и эффекторной памяти, а также клетки TEMRA. С использованием CD27 и CD28 ЕМ и TEMRA цитотоксические Т-клетки были разделены

на дополнительные субпопуляции. Объектом исследования служила венозная кровь, полученная путем пункции периферической вены. Обработку цитофлуориметрических данных проводили при помощи программы Navios Software v.1.2. Статистическую обработку проводили при помощи пакета программ Statistica 8.0. Результаты анализа представлены в виде средних значений и их средней ошибки. Для оценки достоверности различий использовали непараметрический критерий Манна-Уитни, корреляционный анализ проводили с использованием коэффициента ранговой корреляции  $r$ -Спирмена.

**Результаты.** Обнаружена обратная корреляционная зависимость между увеличением баллов по шкале EDSS и относительным содержанием Т-лимфоцитов в периферической крови больных РС ( $r = -0,372$ ,  $p = 0,013$ ). Аналогичная зависимость была выявлена между увеличением баллов EDSS и снижением относительного содержания Т-хелперов ( $r = -0,355$ ,  $p = 0,019$ ), причем если в группе 1 содержание этих клеток в среднем оставляло  $37,23 \pm 1,99\%$ , то в группе 2 снижалось до  $33,91 \pm 2,51\%$ , что было достоверно ( $p < 0,001$ ) ниже таковых группы сравнения  $49,06 \pm 1,12\%$ . Выявлена обратная зависимость между баллами EDSS и относительным содержанием «наивных» Т-хелперов ( $r = -0,467$ ,  $p = 0,002$ ), причем значения, полученные для группы 1, достоверно ( $p = 0,018$ ) превосходили показатели группы 2 и составляли  $33,95 \pm 3,35\%$  и  $27,58 \pm 2,77\%$  от общего числа Т-хелперов, соответственно. Анализ Т-хелперов с фенотипом CD45RA<sup>-</sup>CD62L<sup>-</sup> показал, что увеличение относительного числа этих клеток находится в прямой зависимости от тяжести заболевания ( $r = -0,566$ ,  $p < 0,001$ ). У больных РС с EDSS  $\geq 3$  он достоверно ( $p = 0,018$ ) превосходил значения, полученные для условно здоровых доноров, которые составляли в среднем  $31,39 \pm 1,92\%$  и  $24,52 \pm 2,38\%$ , соответственно. Более того, в этой же группе больных было отмечено почти двукратное увеличение Т-хелперов популяции TEMRA по сравнению с группой сравнения ( $p = 0,035$ ), тогда как данный показатель превосходил значения в группе пациентов с EDSS  $< 3$  более чем в три раза ( $p = 0,019$ ). Отмечено постепенное уменьшение относительного содержания цитотоксических Т-клеток по мере увеличения тяжести заболевания (с  $22,67 \pm 1,58\%$  до  $18,24 \pm 1,21\%$  при  $p = 0,016$ ), однако достовер-

ные различия были отмечены только между показателями в группе 2 и здоровыми донорами ( $p < 0,001$ ). У больных с РС по мере нарастания инвалидизации имеет место снижение относительного содержания, в первую очередь, «наивных» CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> клеток в периферической крови ( $r = -0,388$ ,  $p = 0,010$ ). Хотя достоверные отличия от контрольной группы были зарегистрированы только в случае группы больных с баллами EDSS  $\geq 3$ , когда отмечалось снижение данной популяции с  $33,56 \pm 2,24\%$  до  $23,74 \pm 2,57\%$  ( $p = 0,004$ ), соответственно. Среди различных популяций клеток EM – EM1, EM2, EM3 и EM4 с фенотипами CD27<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>, CD27<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>, CD27<sup>-</sup>CD28<sup>-</sup> и CD27<sup>-</sup>CD28<sup>+</sup>, соответственно – в группах 1 и 2 больных РС отмечено достоверное снижение клеток EM1 до  $14,80 \pm 2,21\%$  ( $p = 0,002$ ) и  $15,25 \pm 1,36\%$  ( $p = 0,004$ ), соответственно, по сравнению контрольной группой, в рамках которой данная популяция составляла  $21,00 \pm 1,39\%$  от общего числа цитотоксических Т-клеток.

Полученные нами результаты о снижении относительного содержания «наивных» Т-хелперов, равно как и наличие связи между баллами EDSS и данным показателем, подтверждаются данными литературы, указывающими на тот факт, что развитие РС связано с нарушением функций тимуса и процессов созревания Т-клеток [2]. В периферической крови наблюдается резкое снижение клеток данной популяции, экспрессирующих CD31 – маркер «тимических наивных» Т-клеток – и содержащих фрагменты TREС, образовавшиеся в результате реаранжировки Т-клеточного рецептора. Более того, снижение относительного содержания «наивных» Т-хелперов и увеличение уровня циркулирующих Т-хелперов эффекторной памяти отмечается и другими группами исследователей [3]. Причем, в случае Т-хелперов, подобная динамика была особенно выражена у больных с высоким баллом по шкале EDSS. Что же касается цитотоксических Т-клеток, то в большинстве работ приводятся результаты, свидетельствующие об увеличении числа циркулирующих CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> лимфоцитов [3, 4]. Увеличение уровня циркулирующих CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> лимфоцитов с фенотипом клеток эффекторной памяти было отмечено у больных РС, что, по мнению авторов, указывало на системную активацию данного звена приобретенного иммунитета [5].

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кудрявцев И. В. Росс. имм. журнал 2014, 8 (17) 4, 947-964.
2. Haegert D. G., Hackenbroch J. D., Duszczyszyn D., Fitz-Gerald L., Zastepa E., Mason H., Lapierre Y., Antel J., Bar-Or A. J Neuroimmunol 2011, 233, 233-239.
3. Mikulkova Z., Praksova P., Stourac P., et al. Neurol Sci 2011, 300, 135-141.
4. Столяров И. Д., Петров А. М., Ильвес А. Г. Аллергология и иммунология 2009, 10 (3), 370-372.
5. Haegle K. F., Stueckle C. A., Malin J. P., Sindern E. J. Neuroimmunol 2007, 183, 168-174.

### ANALYSIS OF THE LEVEL OF DIFFERENTIATION OF T-LYMPHOCYTES IN PERIPHERAL BLOOD OF PATIENTS WITH MULTIPLE SCLEROSIS

Kudryavtsev I. V.<sup>1,2</sup>, Serebryakova M. K.<sup>1</sup>, Petrov A. M.<sup>3</sup>, Stolyarov I. D.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Federal State Budgetary Scientific Institution "Institute of Experimental Medicine", St. Petersburg;

<sup>2</sup>School of Biomedicine of Far Eastern Federal University, Vladivostok; <sup>3</sup>Institute of Human Brain named after N. P. Bechtereva RAS, St. Petersburg, Russia

CD45RA and CD62L expression on CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells in peripheral blood of 18 patients with EDSS<3 and 25 patients with EDSS≥3 with multiple sclerosis (MS) and 30 healthy controls were analysed by flow cytometric measurements. The significant decrease of CD3<sup>+</sup> and CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> cell correlated with increase in EDSS. MS patients had a decreased frequency of CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> T helpers and cytotoxic T cells that correlated with the increase in EDSS. There was a significant increase of CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CD62L<sup>-</sup> cell in peripheral blood of MS patients compared to healthy controls, indicating systemic immune activation.

### ЭКСПРЕССИЯ КОСТИМУЛИРУЮЩИХ МОЛЕКУЛ И HLA-DR В-ЛИМФОЦИТАМИ ПРИ АУТОИММУННОМ ТИРЕОИДИТЕ

Куклина Е. М., Смирнова Е. Н.<sup>1</sup>, Некрасова И. В., Балашова Т. С.<sup>1</sup>

ФГБУН Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук; <sup>1</sup>ГОУ ВПО Пермская государственная медицинская академия имени академика Е. А. Вагнера» МЗ РФ, Пермь, Россия

В системах *ex vivo* и *in vitro* определена экспрессия факторов, необходимых для реализации антигенпрезентирующей функции, CD80, CD86 и HLA-DR, В-лимфоцитами пациентов с аутоиммунным тиреоидитом (АИТ). Показано, что АИТ ассоциирован с повышенной экспрессией костимулирующей молекулы CD80 наивными В-лимфоцитами (CD19<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>клетки) – как *ex vivo*, так и в ответ на поликлональную активацию клеток в культуре. Выявленные в работе эффекты указывают на возможное участие В-лимфоцитов в развитии АИТ за счет антигенпрезентирующей активности.

**Ключевые слова:** CD80, CD86, HLA-DR, В-лимфоциты.

Согласно традиционным представлениям, в основе патогенеза аутоиммунных тиреоидитов (АИТ) лежит поражение тиреоидной ткани аутоспецифичными Т-лимфоцитами, которое в зависимости от типа аутоантигена

может приводить к развитию как гипер- так и гипотиреоза. Роли В-лимфоцитов в этом процессе серьезного значения не придавали. Между тем, участие В-клеточного звена иммунитета в развитии данной патологии убе-

дительно продемонстрирована еще в работах 2000-х годов. Так, показано, что истощение В-клеточной популяции у мышей, склонных к спонтанному развитию аутоиммунных тиреоидитов, вызывает устойчивость к данной патологии [1]. Кроме того, В-лимфоциты интенсивно инфильтрируют щитовидную железу при аутоиммунных тиреоидитах, с формированием в тиреоидной ткани зародышевых центров, аналогичных таковым во вторичных лимфоидных органах. Для АИТ, ассоциированных с первичным гипотиреозом, такие образования выявляются в 70-100% случаев [2, 3]. При этом установлено, что подавление аутоиммунных процессов в ответ на истощение В-клеточной популяции не связано с продукцией аутоантител, так как их введение не приводит к развитию патологии [1]. Все сказанное выше указывает на необходимость исследования роли В-лимфоцитов в развитии АИТ, в первую очередь – изучения В-клеточных функций, не связанных с продукцией антител. В современной литературе данных по этой проблеме нет. Целью настоящей работы была оценка потенциальной антигенпрезентирующей способности В-лимфоцитов пациентов с АИТ, в частности, экспрессии факторов, играющих ключевую роль в этом процессе – костимулирующих молекул CD80/CD86 и молекулы МНС II класса HLA-DR – *ex vivo* и *in vitro*.

В работе исследовали лейкоциты пациентов с достоверным диагнозом «Аутоиммунный тиреоидит», поставленным согласно клиническими рекомендациям (2002): все пациенты имели первичный гипотиреоз (ТТГ >4 мЕд/л), антитела к тиреоидной пероксидазе (ТПО) и сонографические признаки заболевания. Средний возраст пациентов –  $30,6 \pm 1,59$  лет. Контрольную группу составляли здоровые доноры – эутиреоидные лица с отсутствием тиреоидных заболеваний в анамнезе и негативные в отношении анти-тиреоидных антител (к ТПО). Мононуклеарные клетки выделяли из гепаринизированной венозной крови центрифугированием в градиенте плотности фиколл-верографина ( $1,077 \text{ г/см}^3$ ). Суспензию мононуклеарных клеток фракционировали далее на иммуномагнитных бусах (Invitrogen) для получения CD19<sup>+</sup> В-лимфоцитов. CD19<sup>+</sup> В-клетки культивировали 48 часов – без активатора (спонтанный вариант) или в условиях поликлональной активации (анти-IgM/IgG +

CD40L, Jackson ImmunoResearch Laboratories). Потенциальная способность В-клеток презентировать антигены оценивалась по экспрессии костимулирующих молекул, необходимых для адекватного ответа Т-лимфоцита на презентируемый антиген, – CD80, CD86, а также молекулы главного комплекса гистосовместимости II класса HLA-DR, в составе которой В-лимфоциты представляют антиген CD4<sup>+</sup> Т-клеткам. Эти показатели оценивались *ex vivo* (в суспензии мононуклеарных клеток) и *in vitro* (в культуре фракционированных CD19<sup>+</sup>-клеток), отдельно в наивных В-лимфоцитах (CD19<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>) и В-клетках памяти (CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>) – проточной цитометрией. Во всех пробах оценивался как процент клеток, несущих конкретный маркер, так и уровень экспрессии данного маркера, определяемый как средняя интенсивность свечения клеток (Mean Fluorescence Intensity, MFI). Статистический анализ проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента.

В эксперименте *ex vivo* показано, что экспрессия костимулирующих молекул, CD80 и CD86, статистически значимо выше в популяции В-клеток памяти по сравнению с наивными В-лимфоцитами – как у здоровых доноров, так и у пациентов с АИТ. При этом был повышен не только процент клеток, несущих данные маркеры, но и уровень экспрессии этих маркеров. Сопоставление показателей экспрессии костимулирующих молекул между группами выявило повышение у пациентов с АИТ доли CD80-позитивных клеток в субпопуляции наивных В-лимфоцитов (CD19<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>клеток):  $0,219 \pm 0,054\%$  для здоровых доноров и  $1,01 \pm 0,259\%$  для пациентов с АИТ,  $p < 0,05$ . Аналогичные изменения показаны и для уровня экспрессии CD80 на данных клетках, MFI:  $57,7 \pm 8,20$  у.е. у здоровых доноров и  $101 \pm 23,8$  у.е. у пациентов с АИТ,  $p < 0,05$ . Для В-клеток памяти (CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>-лимфоцитов) аналогичных изменений не выявлено. Анализ экспрессии CD86 также показал отсутствие статистически значимых отличий между группами пациентов с АИТ и здоровых доноров. Молекула HLA-DR конститутивно присутствовала на В-лимфоцитах здоровых доноров, и для пациентов с АИТ статистически значимых отклонений ни в количестве HLA-DR-позитивных клеток, ни в уровне экспрессии данной молекулы, не выявлено.

Культивирование фракционированных В-лимфоцитов в отсутствие активатора не вызвало статистически значимых изменений в экспрессии CD80 В-лимфоцитами, но привело к повышению экспрессии данного маркера в условиях ВСР-зависимой поликлональной активации клеток. Сопоставление показателей между группами выявило повышение экспрессии CD80 наивными В-лимфоцитами пациентов с АИТ в случае активации, причем не только уровня экспрессии костимулирующей молекулы ( $121 \pm 14,1$  у.е. для здоровых доноров и  $199 \pm 30,8$  у.е. для пациентов с АИТ,  $p < 0,05$ ), но и процента В-лимфоцитов, несущих данный маркер ( $1,56 \pm 0,289\%$  для здоровых доноров и  $9,16 \pm 2,48\%$  для пациентов с АИТ,  $p < 0,05$ ).

В целом, из трех исследованных факторов, участвующих в презентации антигена, достоверные изменения у пациентов с АИТ выявлены только для костимулирующей молекулы CD80: ее экспрессия была повышена на наивных В-лимфоцитах таких пациентов при оцен-

ке как *ex vivo*, так и *in vitro*, в условиях активации клеток. И хотя способность эффективно представлять антигены убедительно показана для В-клеток памяти [10-12], участие наивных лимфоцитов в этом процессе не исключено, особенно при аутоиммунном поражении щитовидной железы, в условиях ограниченного доступа в тиреоидные ткани профессиональных антигенпрезентирующих клеток.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект № 14-04-96007).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Braley-Mullen H., Yu S.J. Immunol. 2000, 165, 7262-7269.
2. Armengol M. P., Juan M., Lucas-Martin A. et al. Am. J. Pathol. 2001, 159, 861-873.
3. Kaczmarek E., Lacka K., Jamolowska-Jurczyszyn D. et al. J. Clin. Pathol. 2011, 64, 626-630.
4. Good K.L., Avery D.T., Tangye S.G. J. Immunol. 2009, 182, 890-901.
5. Vascotto F., Le Roux., Lankar D. Curr. Opin. Immunol. 2007. 19, 93-98.

### EXPRESSION OF COSTIMULATING MOLECULES AND HLA-DR BY B LYMPHOCYTES IN AUTOIMMUNE THYREOIDITE

Kuklina E. M., Smirnova E. N., Nekrasova I. V., Balashova T. S.

*Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, UB RAS,  
Perm, Russia*

In the *ex vivo* and *in vitro* systems the expression of factors involved in antigen presenting function realization, CD80, CD86 and HLA-DR, of B lymphocytes of autoimmune thyreoidite (AIT) patients has been studied. AIT was shown to be associated with the increased expression of costimulating molecule CD80 by naïve B lymphocytes (CD19<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>cells) – *ex vivo*, as well as in response to polyclonal cell activation in culture. The effects revealed indicate a possible involvement of B lymphocytes in AIT development through their antigen-presenting activity.

## ПРОГНОСТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ АУТОАНТИТЕЛ ПРИ ГЕМАТОГЕННОМ ОСТЕОМИЕЛИТЕ

Москалец О. В.

*МОНИКИ им. М. Ф. Владимирского, Москва, Россия*

У 74 детей с гематогенным остеомиелитом определяли содержание антител к двуспиральной ДНК, ANA, ANCA, антител к фосфолипидам в сыворотке крови. Нормальный уровень антител был выявлен у 40,4% больных ОГО и 27,7% ХГО. Нарастание количества антител к двуспиральной ДНК и/или ANCA ассоциировалось с неблагоприятным прогнозом (торпидное течение, переход в хроническую форму, патологические переломы). Снижение уровня этих антител в динамике ассоциировалось с клинической ремиссией.

*Ключевые слова:* остеомиелит, аутоантитела, прогноз.

Одним из краеугольных камней иммунологии являются феномены аутоотолерантности и аутоагрессии. В случае срыва механизмов аутоотолерантности развивается иммунный ответ против «своего», и ключевая роль в этом процессе отводится аутоантителам, которые могут фиксироваться на клетках и вызывать их повреждение. Однако далеко не всегда выявление аутоантител ассоциируется с каким-либо конкретным аутоиммунным заболеванием. И еще со времен П. Эрлиха и А. М. Безредко ведутся споры о том, является ли присутствие аутоантител патологией или нормой.

За последнее десятилетие представления о биологической роли аутоантител существенно расширились и дополнились. Так, установили, что они играют важную транспортную роль, участвуя в клиренсе продуктов деградации ДНК, возникающих в процессе воспаления, некроза, апоптоза [3]; они регулируют воспалительные реакции, ограничивая продукцию провоспалительных цитокинов, процессы пролиферации и репарации [4], некоторые аутоантитела обладают каталитическими функциями, то есть являются еще и ферментами [2]. Наконец, по мнению некоторых авторов, аутоантитела можно отнести к первой линии защиты против микроорганизмов, наряду с такими факторами врожденного иммунитета как лизоцим, лактоферрин и др. [5].

Несмотря на то, что феномен аутореактивности описан при многих патологических со-

стояниях и существует огромное количество экспериментальных и клинических данных, демонстрирующих возможность развития аутоиммунной патологии при тех или иных инфекционных процессах, до сих пор мало внимания уделяется мониторингу уровня этих аутоантител и их прогностическому значению. Вместе с тем, определение уровня аутоантител может оказаться, наряду с такими известными иммунологическими показателями, как маркеры клеточной поверхности лимфоцитов, уровень основных классов иммуноглобулинов, комплемента, характеристики фагоцитоза, важным лабораторным критерием, позволяющим оптимизировать тактику ведения пациентов при различной соматической патологии.

В хирургии детского возраста одним из самых распространенных видов острой хирургической инфекции является острый гематогенный остеомиелит, который часто отличается тяжелым течением, склонностью к хронизации воспалительного процесса и довольно высокой частотой неблагоприятных исходов (патологические переломы, ложные суставы, укорочение и деформация конечностей). Не менее актуальной проблемой является проблема хронического остеомиелита, при лечении которого отмечаются неудовлетворительные результаты в 8-20% случаев [1].

Мы предположили, что аутоиммунные механизмы могут участвовать в патогенезе гема-



тогенного остеомиелита и быть одним из факторов, способствующих переходу заболевания в хроническую форму.

**Целью** данного исследования было изучение спектра органонеспецифичных аутоантител и частоты их выявления при остром и хроническом гематогенном остеомиелите.

**Материалы и методы:** В сыворотке крови методом иммуноферментного анализа определяли содержание антител к двуспиральной ДНК, антиядерные антитела (ANA), суммарные антифосфолипидные антитела (АФС) классов М и G, включающие антитела к кардиолипину, фосфатидиловой кислоте, фосфоинозитолу и фосфатидилсерину, антинейтрофильные антитела (ANCA), которые включали антитела к миелопероксидазе, протеиназе-3, бактерицидному белку, увеличивающему проницаемость (BPI), эластазе, катепсину G, лизоциму и лактоферрину. Использовали коммерческие тест-системы фирмы Orgentec (Германия).

**Результаты.** Обследовано 74 ребенка с гематогенным остеомиелитом в возрасте от 4 мес. до 15 лет, в том числе 52 – с острым гематогенным остеомиелитом (ОГО) и 22 – с хроническим гематогенным остеомиелитом (ХГО). Нормальный уровень аутоантител наблюдался у 21 (40,4%) больного ОГО и лишь у 6 (27,7%) ХГО.

При ОГО в большинстве случаев повышение антител к двуспиральной ДНК было незначительным (21-30 ЕД/мл). Если исходный уровень был выше (30-40 ЕД/мл), течение заболевания было более тяжелым или длительным, хотя исходы были благоприятными. При более высоких значениях этого показателя, и особенно, при нарастании уровня этих аутоантител в динамике заболевание принимало хроническое течение, формировались патологические переломы. У большинства больных с благоприятными исходами по мере регрессирования патологического процесса уровень аутоантител к двуспиральной ДНК снижался.

При ХГО повышенный уровень антител к двуспиральной ДНК встречался значительно

чаще (практически у каждого второго больного), причем у 36% он превышал 40 ЕД/мл. Нормализация этого показателя ассоциировалась с клинической ремиссией.

Повышенное содержание ANCA, наоборот, значительно чаще регистрировалось при ОГО (50%). В большинстве случаев были повышены антитела к эластазе (26,7%) и к BPI (20,2%).

Одновременное повышение уровня различных аутоантител ассоциировалось с неблагоприятным течением заболевания (вялотекущий воспалительный процесс, формирование гнойных свищей, патологических переломов в отдаленном периоде).

**Заключение.** Согласно полученным данным, и при остром, и при хроническом гематогенном остеомиелите у значительной части больных повышено содержание антител к двуспиральной ДНК и антинейтрофильных антител (преимущественно, антител к BPI и эластазе), а их уровень, особенно в динамике, как правило, коррелирует с активностью патологического процесса.

По-видимому, избыточное образование этих аутоантител, ассоциирующихся с процессами воспаления и апоптоза, является маркером неблагоприятного течения гематогенного остеомиелита (развитие патологических переломов и переход в хроническую форму при остром гематогенном остеомиелите, торпидное течение при хроническом гематогенном остеомиелите). В таких случаях требуется более активная тактика лечения и более длительное наблюдение за больным.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Акжигитов Г.Н., Юдин Я.Б. // М.: Медицина, 1998. – 288 с.
2. Невинский Г.А., Каньшкова Т.Г., Семенов Д.В., Бунева В.Н. // Вестн. РАМН, 2001; № 2 – с.38-45.
3. Cohen I. R., Young D. B. // Immunol. Today, 1991. – v.12 (3). – p.105-110.
4. Marchalioni J.J., Scheuter S. F., Sepulveda R. F., et al. // Ann.N.Y.Acad.Sci., 2005. – 1057. – p.247-249.
5. Rose B. T., Deshpande S. Rev. Med. Virol., 2002. – v.12 (2). – p.107-113.

## PROGNOSTIC SIGNIFICANCE OF AUTOANTIBODIES IN HEMATOGENOUS OSTEOMYELITIS

Moskalets O. V.

*The State Budgetary Healthcare Institution of Moscow Region "Moscow Regional  
Research Clinical Institute after M. F. Vladimirsky", Moscow, Russia*

74 children with hematogenous osteomyelitis were examined for serum concentrations of non-organospecific autoantibodies (anti-dsDNA, ANCA, ANA, total antiphospholipid autoantibodies). Normal autoantibody levels were revealed in 40,4% cases of AHO and only in 27,7% cases of CHO. Laboratory monitoring demonstrated that further increasing of anti-dsDNA and/or ANCA levels were associated with severe course of the disease or complications in future. Normalization of values was associated with clinical remission.

---

---

## ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ЛАТЕНТНОГО АУТОИММУННОГО ДИАБЕТА У ВЗРОСЛЫХ

Прохоренко Т. С.<sup>1</sup>, Саприна Т. В.<sup>1</sup>, Новицкий В. В.<sup>1,2</sup>,  
Ворожцова И. Н.<sup>1</sup>, Рязанцева Н. В.<sup>2,3</sup>

*<sup>1</sup>ГБОУ ВПО Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России,  
Томск; <sup>2</sup>ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский государственный  
университет», Томск; <sup>3</sup>ГБОУ ВПО Красноярский государственный медицинский  
университет имени профессора В. Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава России,  
Красноярск, Россия*

В клинической практике актуальным остается вопрос о формировании и внедрении диагностического подхода, позволяющего на раннем этапе дифференцировать сахарный диабет 2 типа (СД2) и латентный аутоиммунный сахарный диабет взрослых (LADA). Цель исследования – определение наиболее значимых иммунологических параметров для выделения пациентов с LADA среди пациентов с СД2. В исследование включено 135 пациентов с сахарным диабетом (СД1, СД2, LADA) и 30 здоровых доноров. Проведено иммунофенотипирование лимфоцитов, определение концентрации аутоантител (GAD, ICA, IAA). Результаты – у пациентов с аутоиммунными вариантами сахарного диабета (СД1, LADA) повышено количество Т-лимфоцитов и значимо снижено количество CD16<sup>+</sup>CD56<sup>low</sup>-клеток (NK-клетки). Большинство пациентов с LADA можно идентифицировать на основании повышенного титра антител к GAD и ICA. На основании определения этих двух аутоантител и иммунофенотипирования лимфоцитов крови можно надежно верифицировать LADA среди пациентов с фенотипом сахарного диабета 2 типа.

*Ключевые слова:* аутоиммунный диабет, лимфоциты, аутоантитела, диагностика.

**Актуальность.** Современной тенденцией развития здравоохранения является своевременная, точная диагностика и патогенетически обоснованная терапия заболеваний. Известно, что около 10% пациентов с диагнозом сахарного диабета 2 типа (СД2) в действительности страдают от латентного аутоиммунного поражения поджелудочной железы [1] и нуждаются в специфической для данного вида патологии терапии (значительно отличающейся

от лечения сахарного диабета 2 типа). В связи с этим становится актуальным вопрос о формировании и внедрении диагностического подхода, позволяющего на раннем этапе дифференцировать СД2 и LADA. В процессе изучения патогенеза латентного аутоиммунного диабета взрослых (LADA) были выявлены различные особенности метаболизма и функционирования иммунной системы пациентов [2, 3, 4, 5]. Однако, оценка показателей, наи-

более четко отличающих LADA от других типов диабета (например, продукция различных цитокинов или презентация рецепторов к интерлейкинам на клетках крови), проводится с помощью методов, сложно воспроизводимых при клиническом применении. Поэтому представляется рациональным строить диагностические алгоритмы, отталкиваясь от показателей, имеющих стандартизированные методики определения.

**Цель исследования:** выявить особенности субпопуляционного состава лимфоцитов крови и спектра аутоантител к структурам поджелудочной железы у пациентов с латентным аутоиммунным диабетом взрослых для оптимизации лабораторных алгоритмов диагностики сахарного диабета.

**Материал и методы исследования.** Обследованы пациенты, проживающие на территории Томска и Томской области, в возрасте от 18 до 45 лет с сахарным диабетом типа 1 (СД1) (37 человек, средний возраст –  $34,6 \pm 2,0$  года), типа 2 (СД2) (67 человек, средний возраст –  $42,9 \pm 1,1$  года), латентным аутоиммунным диабетом взрослых (LADA) (31 человек, средний возраст –  $39,7 \pm 9,0$  года). Подгруппа с LADA была выделена из группы пациентов с СД типа 2 при наличии положительного титра аутоантител к инсулярному аппарату поджелудочной железы (GAD, ICA, IAA). Стаж заболевания пациентов не превышал 10 лет. Все группы с СД были сопоставимы по уровню гликированного гемоглобина (HbA1c равен 8,4%, 8,6% и 8,4% при СД1, LADA и СД2, соответственно). Контрольную группу составили 30 здоровых доноров (средний возраст –  $45,3 \pm 5,6$  года). Все лица, участвующие в исследовании, дали информированное согласие на участие. Исследование соответствовало требованиям локального этического комитета.

Материалом для исследования являлась венозная кровь, стабилизированная этилендиаминтетраацетатом, взятая утром до приема пищи и сыворотка крови, для получения которой венозную кровь набирали в вакуумные пробирки с активатором свертывания кремнеземом.

Проводили иммунофенотипирование лимфоцитов крови по наличию CD3-, CD4-, CD8-, CD16CD56-, CD19-маркеров методом проточной лазерной цитофлуориметрии с использованием моноклональных антител («BD Multitest 6 color TBNK», США) на проточном цитоме-

тре FacsCanto II («Becton Dickinson», США). Оценивали концентрацию антител к инсулину (IAA) («Orgentec», Германия), к поверхностному антигену  $\beta$ -клетки (ICA) и декарбоксилазеглутаминовой кислоты (GAD) («Biomerica», США) методом иммуноферментного анализа в сыворотке крови в соответствии с инструкциями производителей тест-систем.

**Результаты исследования.** При оценке субпопуляционного состава лимфоцитов крови наиболее значимыми результатами явились изменения количества Т- и NK-лимфоцитов. Относительное содержание Т-лимфоцитов в периферической крови у здоровых доноров составило 69,70 (65,94-70,90)%. Количество CD3<sup>+</sup>-лимфоцитов у больных СД1 [73,69 (70,86-76,18)%] и у пациентов с LADA [75,81 (73,13-79,31)%] достоверно превышало такое у здоровых лиц ( $p=0,04$  и  $p=0,008$ , соответственно). Содержание CD16<sup>+</sup>CD56<sup>low</sup>-клеток у пациентов с СД1 [13,71 (10,37-17,07)%] и с LADA [11,60 (9,10-14,36)%] оказалось значимо ниже их числа у здоровых доноров [17,24 (16,18-19,88)%,  $p=0,03$  и  $p=0,007$ , соответственно]. При этом у пациентов с СД2 (группа сравнения) подобные изменения субпопуляционного состава лимфоцитов, относительно значений в контроле, обнаружены не были, что подчеркивает связь выявленных отклонений клеточного состава с развитием сахарного диабета аутоиммунного генеза.

Увеличение количества Т-клеток в данном случае можно рассматривать с позиции утраты контроля над аутореактивными клонами лимфоцитов и активации Т-клеточного звена иммунитета. Поскольку NK-лимфоциты являются иммунорегуляторными клетками звена врожденного иммунитета, то недостаток их количества может отягощать аутореактивное повреждение поджелудочной и щитовидной желез. Помимо этого, можно предположить, что дефицит NK-клеток является одним из факторов, способствующих срыву аутоагрессивности и формированию аутоиммунного сахарного диабета.

При оценке концентрации в сыворотке крови органоспецифических антител было показано, что аутоантитела хотя бы одного типа (GAD, ICA, или IAA) в крови были выявлены у 23% обследованных нами пациентов с клиническим фенотипом СД2, что позволило идентифицировать LADA у данных больных. Антитела к GAD выявлены у 12,2% пациен-

тов с клиническим фенотипом СД2, которые в итоге составили 38,7% всех обследованных пациентов с LADA. Детальный анализ показал, что среди больных с клиническим фенотипом СД2 ICA определялись у 22,4% человек, которые составили 71,0% от всех обследованных пациентов с LADA. Антитела к инсулину (IAA) выявлены у 3,1% больных с клиническим фенотипом СД2 – у, составивших 9,7% всех обследованных пациентов с LADA.

Сравнительный анализ концентрации аутоантител в зависимости от клинического фенотипа аутоиммунного СД показал, что уровень антител к декарбоксилазеглутаминовой кислоте (GAD) и к поверхностному антигену  $\beta$ -клетки (ICA) у пациентов с LADA достоверно выше ( $p=0,02$  и  $p=0,03$ , соответственно) такового у пациентов с СД1.

Таким образом, с целью верификации диагноза LADA целесообразно одновременно идентифицировать присутствие в сыворотке крови двух типов аутоантител (ICA и GAD). Большим преимуществом данного вида теста является общедоступность необходимо-

го оборудования для проведения иммуноферментного анализа и достаточного выбора тест-систем для определения интересующих аналитов. Выявленное количественное изменение содержания в крови Т-лимфоцитов и лимфоцитов натуральных киллеров также может являться вспомогательным критерием выявления лиц с аутоиммунным поражением поджелудочной железы среди пациентов с первоначальным диагнозом СД2.

Работа подготовлена при финансовой поддержке Гранта совета при Президенте РФ для ведущих научных школ (№ НШ-4184.2014.7).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Смирнова О. М., Кононенко И. В., Дедов И. И. Сахарный диабет. – 2008. – № 4. – С. 18-23.
2. Саприна Т. В. и соавт. Бюллетень сибирской медицины. – 2014. – № .1 – С. 73-78.
3. Саприна Т. В. и соавт. Сахарный диабет. – 2011. – № 2. – С. 12-17.
4. Саприна Т. В. и соавт. Бюллетень СО РАМН. – 2012. – № 4. – С. 59-65.
5. Tuomi T., Andersen M., Lundgren V. International Diabetes. – 2010. – Vol. 22. – P. 128-131.

### IMMUNOLOGICAL FEATURES OF LATENT AUTOIMMUNE DIABETES IN ADULTS

Prokhorenko T.S.<sup>1</sup>, Saprina T.V.<sup>1</sup>, Novitsky V.V.<sup>1,2</sup>,  
Vorozhtsova I.N.<sup>1</sup>, Ryazantseva N.V.<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Siberian State Medical University, Tomsk; <sup>2</sup>National Research Tomsk State University, Tomsk;

<sup>3</sup>Voyno-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University, Krasnoyarsk, Russia

The question remains highly topical against the formation and implementation of the diagnostic approach in order to differentiate diabetes mellitus type 2 (T2DM) and latent autoimmune diabetes of adults (LADA). The purpose of research was to identify the most important immunological parameters to identify patients with LADA among the patients with type 2 diabetes. The study included 135 patients with diabetes mellitus (DM1, DM2, and LADA) and 30 healthy donors. Flow cytometry detection of lymphocyte subsets and determination of the autoantibodies' (GAD, ICA, and IAA) concentration were performed. Results: increased number of T-lymphocytes and significantly reduced number of NK-cells in patients with autoimmune diabetes variants (type 1 DM, LADA) were determined. Most patients with LADA can be identified based on the high titer of GAD and ICA antibodies. Based on the definitions of these two autoantibodies and lymphocyte immunophenotyping, LADA phenotype can be reliably verified among the patients with type 2 diabetes mellitus.

## ЗАВИСИМОСТЬ ИНСУЛИН-ИНДУЦИРОВАННОЙ ПРОДУКЦИИ ЦИТОКИНОВ ОТ ВАРИАНТОВ ГЕНОТИПОВ ПОЛИМОРФИЗМОВ *rs 231775* И *rs 3087243* ГЕНА *CTLA-4* У ПАЦИЕНТОВ С САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 1 ТИПА И САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 1 ТИПА В СОЧЕТАНИИ С АУТОИММУННЫМИ ТИРЕОПАТИЯМИ

Репина Е. А.<sup>1</sup>, Болдырева М. Н.<sup>2</sup>, Степанова Е. Н.<sup>3</sup>, Деев А. Д.<sup>4</sup>,  
Шестакова М. В.<sup>1</sup>, Дедов И. И.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБУ «Эндокринологический научный центр» МЗ РФ; <sup>2</sup>ФГБУ «ГНЦ институт иммунологии» ФМБА РФ; <sup>3</sup>ГБОУ ДПО РМАПО МЗ РФ; <sup>4</sup>ФГБУ «ГНИЦ профилактической медицины» МЗ РФ, Москва, Россия

Проведен анализ зависимости инсулин-индуцированной продукции (ИИП) цитокинов от вариантов генотипов полиморфизмов *rs 231775* и *rs 3087243* гена *CTLA-4* у 30 пациентов: 5 пациентов с сахарным диабетом 1 типа (СД1), 18 пациентов с сочетанием СД1 с аутоиммунным тиреоидитом (АИТ), 7 пациентов с сочетанием СД1 с диффузным токсическим зобом (ДТЗ). Контрольную группу составили 10 доноров крови без аутоиммунных заболеваний и отягощенной наследственности по ним. Установлена зависимость уровня ИИП ИЛ-6 от вариантов генотипов полиморфизмов *rs 231775* и *rs 3087243* гена *CTLA-4* (10,24/0,0008 и 3,10 /0,0487). Уровни ИИП ИЛ-1, ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-7, ИЛ-12 и IFN- $\gamma$  были значимо выше у пациентов с G/G генотипами полиморфизма *rs 231775* гена *CTLA-4* по сравнению с генотипами A/A и A/G того же полиморфизма (ИЛ-1 – p=0,0042/p=0,0005; ИЛ-2 – p=0,0025/p=0,0002; ИЛ-4 – p=0,0036/p=0,0036; ИЛ-6 – p=0,0004/p=0,0004; ИЛ-7 – p=0,0176/0,0070; ИЛ-12 – p=0,0573/0,0097 и IFN- $\gamma$  – p=0,0043/p=0,0004). Уровни ИИП ИЛ-1 и ИЛ-6 были значимо выше у пациентов с G/G генотипом полиморфизма *rs 3087243* гена *CTLA-4* по сравнению с генотипом A/G того же полиморфизма (ИЛ-1 – p=0,0357 и ИЛ-6 – p=0,0080). Уровни ИИП ИЛ-10 и TNF- $\alpha$  были значимо выше у пациентов с СД1 по сравнению с пациентами, имеющими комбинацию СД1+АИЗ ЩЖ и здоровыми (ИЛ-1 – p=0,0268 (СД1+АИЗ ЩЖ) /p=0,0033 (здоровые) и TNF- $\alpha$  – p=0,0136 (СД1+АИТ) /p=0,0203 (СД1+ДТЗ) /0,0034 (здоровые). Уровни ИИП ИЛ-1 и ИЛ-8 были значимо выше у пациентов с сочетанием СД1 и ДТЗ по сравнению с пациентами с сочетанием СД1 и АИТ, а также здоровыми лицами (ИЛ-1 – p=0,0033/0,0243). Полученные данные свидетельствуют о зависимости особенностей течения аутоиммунного воспаления в шоковых органах при СД1 и АИЗ ЩЖ от вариантов генотипов полиморфизмов *rs 231775* и *rs 3087243* гена *CTLA-4*.

**Ключевые слова:** сахарный диабет 1 типа, аутоиммунные тиреопатии, ген *CTLA-4*, полиморфизмы, цитокины.

Генетическая предрасположенность играет определяющую роль в механизмах манифестации и прогрессирования аутоиммунных заболеваний [1]. При этом скорость и степень аутоиммунной агрессии в шоковом органе зависит от многих факторов, в том числе от вариантов генотипов предрасполагающих генов.

К настоящему времени известно 20 генов, находящихся на разных хромосомах, которые в той или иной степени предрасполагают к развитию аутоиммунного воспаления. Некоторые из них ассоциированы исключительно

но с конкретными аутоиммунными заболеваниями (АИЗ), другие, и таких большинство, являются общими для многих АИЗ [3, 5].

К числу таких генов относится и ген *CTLA-4*. Он занимает около 6,2 kb на второй хромосоме (2q33) и состоит из 4 экзонов. Его белковый продукт играет ключевую роль в механизмах Т-клеточной регуляции. В связи с этим, особый интерес представляет изучение влияния различных вариантов этого гена на особенности течения аутоиммунного воспаления у пациентов с СД1 и АИЗ ЩЖ.

В многочисленных исследованиях, проведенных в разных странах, была доказана ассоциация полиморфизмов гена *CTLA-4* с развитием целого ряда аутоиммунных заболеваний: сахарного диабета 1 типа (СД1), аутоиммунных заболеваний щитовидной железы (АИЗ ЩЖ) – аутоиммунного тиреоидита (АИТ), диффузного токсического зоба (ДТЗ), болезни Аддисона, целиакии и других [1, 2, 4, 5].

Наиболее часто в литературе упоминаются два полиморфизма этого гена: *rs 231775 (49 A/G)* и *rs 3087243 (CT60 A/G)*. Первый из них расположен в первом экзоне и характеризуется заменой треонина на аланин в 17 кодоне лидерного пептида. Полиморфный маркер *rs 3087243*, расположен в промоторной области гена *CTLA-4*, кодирует антиген 4 цитотоксических Т-лимфоцитов и отвечает за уровень активации Т-клеток [2]. В предыдущих исследованиях было показано, что оба этих полиморфизма ассоциированы со многими АИЗ [2, 4, 5].

**Целью** настоящего исследования является изучение зависимости уровней инсулин-индуцированной продукции цитокинов от вариантов генотипов двух полиморфизмов *rs 231775* и *rs 3087243* гена *CTLA-4* у пациентов с СД1 и пациентов, имеющих сочетание СД1 с АИЗ ЩЖ.

**Материалы и методы.** В исследование было включено 30 пациентов с СД1, которые находились на обследовании и лечении в ФГБУ «Эндокринологический научный центр» МЗ РФ. Все пациенты были разделены на 3 группы: первую группу составили 5 пациентов с СД1, во вторую группу вошло 18 пациентов с СД1 и аутоиммунным тиреоидитом (АИТ), третью группу составили 7 пациентов с сочетанием СД1 и диффузным токсическим зобом (ДТЗ). Контрольную группу составили 10 человек из Московской популяции без аутоиммунных заболеваний и отягощенной наследственности по ним.

Типирование однонуклеотидных полиморфизмов *rs 231775* и *rs 3087243* гена *CTLA-4* проводили методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с флуоресцентными метками и автоматической регистрацией результатов реакции в режиме реального времени (real-time PCR) наборами компании «ДНК-Технология» (Москва) на приборе ДТ-96 («ДНК-Технология») в соответствии с инструкциями производителя.

Перед определением цитокинов лимфоциты пациентов выделяли из периферической

крови здоровых доноров и больных СД методом градиентного центрифугирования с использованием смеси фиколл-верографина, с плотностью 1,077. Клетки дважды отмывали фосфатно-солевым буфером с pH 7,2 и ресуспендировали в бессывороточной среде RPMI 1640 («Панэко», Россия) с добавлением 5% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) («Панэко», Россия), 20 мкг/мл гентамицина, 2 мМ L-глутамин и 2 мМ NEPES. Суспензию лимфоцитов в концентрации  $10^6$  клеток на 1 мл среды культивировали в пластиковых 24-луночных планшетах («Nunc», Дания) в течение 18-20 часов в CO<sub>2</sub>-инкубаторе.

Культивирование лимфоцитов каждого пациента проводили в 3-х различных вариантах: без добавок – контрольный образец, с добавлением Т-клеточного митогена ФГА в концентрации 5 мкг/мл («Gibco») и образец с добавлением 0,01 МЕ инсулина. По окончании культивирования плашки центрифугировали, супернатанты каждого образца собирали в разные микропробирки и замораживали при  $-70^{\circ}\text{C}$ , до момента исследования в них уровня продукции цитокинов.

Продукцию цитокинов ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-7, ИЛ-8, ИЛ-10, ИЛ-12, ИФН- $\gamma$  и ФНО- $\alpha$  оценивали методом проточной флюориметрии на двухлучевом лазерном автоматическом анализаторе (Bio-Plex Protein Assay System, Bio-Rad, USA). Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием метода дисперсионного анализа с поправкой на пол и возраст. Различия между параметрами считали статистически достоверными при  $p < 0,05$ .

### Результаты

1) инсулин-индуцированный уровень продукции ИЛ-6 зависит от вариантов генотипов полиморфизмов *rs 231775* и *rs 3087243* гена *CTLA-4* (10,24/0,0008 и 3,10 /0,0487).

2) инсулин-индуцированные уровни продукции ИЛ-1, ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-7, ИЛ-12 и ИФН- $\gamma$  были значимо выше у пациентов с G/G генотипами полиморфизма *rs 231775* гена *CTLA-4* по сравнению с генотипами A/A и A/G того же полиморфизма (ИЛ-1 –  $p=0,0042/p=0,0005$ ; ИЛ-2 –  $p=0,0025/p=0,0002$ ; ИЛ-4 –  $p=0,0036/p=0,0036$ ; ИЛ-6 –  $p=0,0004/p=0,0004$ ; ИЛ-7 –  $p=0,0176/0,0070$ ; ИЛ-12 –  $p=0,0573/0,0097$  и ИФН- $\gamma$  –  $p=0,0043/p=0,0004$ ).

3) в то же время, инсулин-индуцированные уровни продукции ИЛ-1 и ИЛ-6 были значи-

мо выше у пациентов с G/G генотипом полиморфизма rs 3087243 гена *CTLA-4* по сравнению с генотипом A/G того же полиморфизма (IL-1 –  $p=0,0357$  и IL-6 –  $p=0,0080$ ).

4) инсулин-индуцированные уровни продукции IL-10 и TNF- $\alpha$  были значимо выше у пациентов с СД1 по сравнению с пациентами, имеющими комбинацию СД1+АИЗ ЩЖ и здоровыми (IL-1 –  $p=0,0268$  (СД1 + АИЗ ЩЖ) /  $p=0,0033$  (здоровые) и TNF- $\alpha$  –  $p=0,0136$  (СД1+АИТ) /  $p=0,0203$  (СД1+ДТЗ) /  $0,0034$  (здоровые)).

5) инсулин-индуцированные уровни продукции ИЛ-1 и ИЛ-8 были значимо выше у пациентов с сочетанием СД1 и ДТЗ по сравнению с пациентами с сочетанием СД1 и АИТ, а также здоровыми лицами (IL-1 –  $p=0,0033/0,0243$ ).

**Выводы.** Варианты генотипов полиморфизмов гена *CTLA-4* определяют особенности течения аутоиммунного воспаления при СД1 и АИЗ ЩЖ, которые отражаются в спектре и уровнях Т-клеточной продукции цитокинов на фоне стимуляции инсулином.

По степени активности воспалительного процесса пациенты исследуемых групп имеют значимые отличия: наиболее агрессивное течение отмечается у пациентов с СД1, промежуточный уровень занимают больных с сочетанием СД1 и ДТЗ, у пациентов с сочетанием СД1 и АИТ имеется наиболее мягкий вариант аутоиммунного воспаления.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абрамов Д. Д., Дедов И. И., Хаитов Р. М., Болдырева М. Н., Алексеев Л. П. Иммунология. – 2012. – № 1. – С. 4–6.
2. Бровкина О. И. Автореф. дис. канд. мед. наук. – Москва, 2012. – 22 с.
3. Репина Е. А. Сахарный диабет. – 2011. – № 2. – С. 23–30.
4. Репина Е. А., Болдырева М. Н., Сунцов Ю. И., Батенева Е. И., Кадочникова В. В., Ильин А. В., Трошина Е. А. Фундаментальные исследования. – 2014. – № 10 (часть 6). – С. 1171–1176.
5. Huber A., Menconi F., Corathers S., Jacobson E. M., Tomer Y. Endocr. Rev. – 2008. – Vol. 29. – P. 697–725.

#### DEPENDENCE OF THE INSULIN-INDUCED CYTOKINE LEVEL PRODUCTION ON GENOTYPE OPTIONS OF rs 231775 AND rs 3087243 CTLA-4 GENE POLYMORPHISMS IN PATIENTS WITH DIABETES MELLITUS TYPE 1 AND TYPE 1 DIABETES COMBINED WITH AUTOIMMUNE THYROPATHIES

<sup>1</sup>Repina E. A., <sup>2</sup>Boldyreva M. N., <sup>3</sup>Stepanova E. N., <sup>4</sup>Deev A. D.,  
<sup>1</sup>Shestakova M. V., <sup>1</sup>Dedov I. I.

<sup>1</sup>FGBU "Endocrinology Research Centre" The Ministry of Health; <sup>2</sup>FGBU "Institute of Immunology" FMBA of Russia; <sup>3</sup>GBOU DPO RMAPO The Ministry of Health; <sup>4</sup>FGBU GBU «State Research Centre of Preventive Medicine» The Ministry of Health, Moscow, Russia

The dependence of insulin-induced production (IIP) of cytokines on genotype options of rs 231775 and rs 3087243 *CTLA-4* gene polymorphisms was studied in 30 patients: 5 patients with type 1 diabetes mellitus (T1DM), 18 patients with a combination of type 1 diabetes with autoimmune thyroiditis (AIT), 7 patients with a combination of type 1 diabetes with Graves' disease (GD). The control group consisted of 10 blood donors without autoimmune diseases and family history on them. We have found the dependence insulin-induced IL-6 level production on genotype options rs 231775 and rs 3087243 *CTLA-4* gene (10,24/0,0008 and 3,10/0,0487) polymorphisms. IIP levels of IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-12 and IFN- $\gamma$  were significantly higher in patients with G/G genotype of rs 231775 *CTLA-4* gene polymorphism in comparison with genotypes A/A and A/G of the same polymorphism (IL-1 –  $p=0,0042/p=0,0005$ ; IL-2 –  $p=0,0025/p=0,0002$ ; IL-4 –  $p=0,0036/p=0,0036$ ; IL-6 –  $p=0,0004/p=0,0004$ ; IL-7 –  $p=0,0176/0,0070$ ; IL-12 –  $p=0,0573/0,0097$  and IFN- $\gamma$  –  $p=0,0043/p=0,0004$ ). At the same time, IIP levels of IL-1 and IL-6 were significantly higher in patients with G/G genotype of rs 3087243 *CTLA-4* gene polymorphism in comparison with genotype A/G of the same polymorphism (IL-1 –  $p=0,0357$  and IL-6 –  $p=0,0080$ ). IIP levels of IL-10 and TNF- $\alpha$  were significantly higher in the patients with T1DM in comparison with patients having a combination of T1DM+AIT TG and healthy people (IL-1 –  $p=0,0268$  (T1DM+GD) /  $p=0,0033$  (healthy people) and TNF- $\alpha$  –  $p=0,0136$  (T1DM+AIT) /  $p=0,0203$  (T1DM+GD) /  $0,0034$  (healthy people)). IIP levels of IL-1 and IL-8 were significantly higher in patients with T1DM+GD in comparison with patients with T1DM+AIT and healthy people (IL-1 –  $p=0,0033/0,0243$ ). So, the level of inflammatory activity is most pronounced in patients with T1DM, an intermediate level seen in patients with a combination of T1DM and GD. Patients with the combination of T1DM and AIT have the least aggressive variant of autoimmune inflammation. The variants of genotypes' combinations of *CTLA-4* gene determine the characteristics of the course of autoimmune inflammation in the shock tissues, which is reflected in the levels of insulin-induced cytokine production in patients with autoimmune diabetes and AIT TG.

## САХАРНЫЙ ДИАБЕТ 1 ТИПА И АУТОИММУННЫЕ ПОЛИГЛАНДУЛЯРНЫЕ СИНДРОМЫ – ИММУНОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ВЗАИМООТНОШЕНИЯ

Репина Е. А.<sup>1</sup>, Болдырева М. Н.<sup>2</sup>, Сунцов Ю. И.<sup>1</sup>, Трошина Е. А.<sup>1</sup>, Шестакова М. В.<sup>1</sup>, Дедов И. И.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБУ «Эндокринологический научный центр» МЗ РФ; <sup>2</sup>ФГБУ «ГНЦ институт иммунологии» ФМБА РФ, Москва, Россия

Проведен сравнительный анализ распределения частот аллелей и генотипов полиморфизмов *rs 2476601* гена *PTPN22* и *rs 231775* гена *CTLA-4* у 249 пациентов с сахарным диабетом 1 типа (СД1): 138 пациентов с изолированным СД1 и 111 пациентов с СД1 в сочетании с аутоиммунными заболеваниями щитовидной железы (АИЗ ЩЖ). Контрольную группу составили 108 доноров крови без аутоиммунных заболеваний (АИЗ) и отягощенной наследственности по ним. Установлена высоко достоверная ассоциация полиморфизма *rs 2476601* гена *PTPN22* с повышенным риском развития сочетания СД1 и АИЗ ЩЖ ( $p=0,006$ ). При этом аллель *T* и генотипы *CT* и *TT* являются факторами высокого риска развития АПС 3а типа – клинического варианта СД1. В то же время, изолированный СД1 ассоциирован с *G(GG)* в *rs 231775* гена *CTLA-4* ( $p=0,0116$ ). При этом мы не получили доказанную ассоциацию этого полиморфизма с СД1 в сочетании с АИЗ ЩЖ. Пациенты, имеющие сочетание СД1 с АИЗ ЩЖ, по распределению аллелей и генотипов полиморфизма *rs 231775* ближе к норме по сравнению с пациентами с изолированным СД1. Варианты сочетаний генотипов полиморфизмов генов *PTPN22* и *CTLA-4* определяют степень предрасположенности к развитию изолированного СД1 или СД1 в сочетании с АИЗ ЩЖ, а также особенности течения аутоиммунного воспаления при АИЗ.

**Ключевые слова:** сахарный диабет 1 типа, аутоиммунный полигландулярный синдром, аутоиммунные тиреопатии, ген *PTPN22*, ген *CTLA-4*, полиморфизмы.

Аутоиммунные полигландулярные синдромы (АПС) – группа заболеваний, связанных с одновременной недостаточностью двух и более эндокринных желез вследствие их аутоиммунного поражения. Согласно последней классификации, наличие у одного пациента АИЗ щитовидной железы (АИЗ ЩЖ) и сахарного диабета 1 типа (СД1) относят к АПС 3а типу. Данный вариант АПС заслуживает особого внимания, т.к. является наиболее частым сочетанием АИЗ.

К настоящему времени известно 20 генов, находящихся на разных хромосомах, которые в той или иной степени предрасполагают к развитию АИЗ. К их числу относятся ген *PTPN22* и ген *CTLA-4*.

Ген *PTPN22* находится на первой хромосоме (1p13.3-p13.1) и кодирует белок тирозиновой фосфатазы, которая играет важную роль в негативном контроле Т-клеточной активации и дифференцировки иммунокомпетентных

клеток [5], а также участвует в механизмах Т-клеточной «иммунологической памяти» [3]. Замена аргининового на триптофановый аминокислотный остаток (кодон 620 – R620W) исключает возможность взаимодействия *PTPN22* с CSK, что приводит к нарушению обратной регуляции активированных лимфоцитов [4].

Ген *CTLA-4* занимает около 6,2 kb на второй хромосоме (2q33) и состоит из 4 экзонов. Его белковый продукт играет ключевую роль в механизмах Т-клеточной регуляции. Наиболее часто в литературе упоминается полиморфизм *rs 231775* (49 A/G) этого гена. Он расположен в первом экзоне и характеризуется заменой треонина на аланин в 17 кодоне лидерного пептида.

В многочисленных исследованиях, проведенных в разных странах, была доказана ассоциация полиморфизмов *rs 2476601* гена *PTPN22* и *rs 231775* гена *CTLA-4* с развитием многих АИЗ, в том числе СД1 и АИЗ ЩЖ [2, 4].



При этом в литературе имеются противоречия, касающиеся наличия/отсутствия ассоциации данных полиморфизмов с тем или иным АИЗ.

**Целью** настоящего исследования является изучение вариантов генотипов полиморфизмов *rs 2476601* гена *PTPN22* и *rs 231775* гена *CTLA-4* у пациентов с СД1 и пациентов, имеющих сочетание СД1 с АИЗ ЩЖ с оценкой их возможного взаимовлияния.

**Материалы и методы.** В исследование было включено 249 пациентов с СД1, которые находились на обследовании и лечении в ФГБУ «Эндокринологический научный центр» МЗ РФ. Все пациенты были разделены на 2 группы: в первую группу вошло 111 пациентов с СД1 и АИЗ ЩЖ, во вторую группу вошло 138 пациентов с изолированным СД1. Контрольную группу составили 108 человек без АИЗ и отягощенной наследственности по ним.

Типирование однонуклеотидных полиморфизмов *rs 2476601* гена *PTPN22* и *rs 231775* гена *CTLA-4* проводили методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с флуоресцентными метками и автоматической регистрацией результатов реакции в режиме реального времени (real-time PCR) наборами компании «ДНК-Технология» (Москва) на приборе ДТ-96 («ДНК-Технология») в соответствии с инструкциями производителя. Статистическую обработку данных проводили с использованием стандартных подходов, используемых при проведении популяционно-генетических исследований.

**Результаты.** Распределения частот генотипов по исследуемым локусам генов *PTPN22* и *CTLA-4* в выборках пациентов всех исследуемых групп соответствует теоретически ожидаемому равновесному распределению Харди-Вайнберга.

**Исследование частоты встречаемости однонуклеотидной замены R620W (*rs 2476601*) гена *PTPN22*.**

Анализ распределения частот аллелей и генотипов полиморфизма *rs 2476601* гена *PTPN22* не выявил повышения встречаемости «редкого» аллеля *T* и генотипа *TT* среди больных СД1, серонегативных по АтЩЖ по сравнению со здоровыми лицами.

Анализ распределения аллелей и генотипов полиморфизма *rs 2476601* гена *PTPN22* среди больных СД1 с АИЗ ЩЖ и доноров выявил достоверное увеличение частоты встречаемо-

сти аллеля *T*,  $p=0,0007$ ,  $OR = 2,26$  (1,4–3,63), и генотипа *TT*,  $p=0,0009$ ,  $OR = 1,4$  (0,43–4,55) в группе пациентов. При этом отношение шансов для носителей «редкого» аллеля *T* составило  $OR = 3,0$  (1,69–5,33),  $p=0,0002$ . Достоверные значения относительного риска для аллеля *T*  $RR = 1,58$  (1,17–2,13) показывают, что аллель *T* можно отнести к аллелям риска для СД1 в сочетании с АИЗ ЩЖ.

Анализ распределения частот аллелей и генотипов полиморфизма *rs 2476601* гена *PTPN22* выявил повышение встречаемости «редкого» аллеля *T* среди больных СД1 в сочетании с АИЗ ЩЖ, – 7/110 (6%) по сравнению с пациентами с изолированным СД1, – 4/134 (3%) ( $OR=1,8$ , 95%  $CI$ : 1,17–2,76,  $p=0,007$ ). Для генотипа *TT* отношение шансов по сравнению с *CC* и *CT* составило  $OR (TT) = 2,21$  (0,63–7,75),  $p = 0,02$ .

Частота носителей «редкого» аллеля *T* у больных СД1+АИЗ ЩЖ (лица с генотипами *CT* и *TT*) была достоверно выше – 55/110 (50%), чем в группе СД1–44/134 (33%),  $OR=2,05$ , 95%  $CI$ : 1,22–3,44,  $p=0,0087$ . Оценочный тест для анализа изменения степени ассоциации между генотипом *PTPN22* полиморфизма *rs 2476601* и определенной клинической формой СД1, в зависимости от числа полиморфных аллелей (тренд-тест Кохрана-Армитажа) показал статистически значимые различия между сравниваемыми генотипами ( $p=0,006$ ), что свидетельствует о наличии тенденции к высокой степени ассоциации генотипа данного полиморфизма с клинической формой СД1 – АПС 3а типа.

Сопоставив данные многочисленных литературных источников и учитывая полученные нами данные, мы высказываем предположение о том, что аллель *T* и генотипы *CT* и *TT* полиморфизма *rs 2476601* гена *PTPN22* являются факторами высокого риска развития не только АПС 3а типа, но и других вариантов сочетаний АИЗ. При этом отдельные компоненты, входящие в сочетание АИЗ клинически протекают более мягко по сравнению с изолированными вариантами АИЗ, что, по-видимому, связано с особенностями иммунного ответа на конкретный антиген(ы).

**Исследование частоты встречаемости однонуклеотидной замены 49 A/G (*rs 231775*), расположенной в первом экзоне гена *CTLA4*.**

Анализ распределения частот аллелей и генотипов полиморфизма *rs 231775* гена *CTLA-4* выявил повышение встречаемости «редкого» аллеля *G* среди больных с изолированным

СД1–148/268 (55%) по сравнению со здоровыми лицами 91/216 (42%) (OR=1,69, 95% CI: 1,18–2,43,  $p=0,005$ ). При этом частота генотипа GG достоверно выше в группе пациентов (34%) по сравнению с группой контроля (17%),  $p=0,0116$ , OR=2,1, 95% CI: 1,21–3,5. Оценочный тест для анализа изменения степени ассоциации между генотипом *rs 231775* гена *CTLA-4* и предрасположенностью к развитию изолированного СД1 в зависимости от числа полиморфных аллелей (тренд-тест Кохрана-Армитажа) показал статистически значимые различия между сравниваемыми генотипами ( $p=0,004$ ), что свидетельствует о наличии тенденции к повышению степени ассоциации данного генотипа с риском развития изолированной формы СД1 при увеличении в генотипе количества аллелей G, что согласуется с данными других исследователей [1].

Анализ распределения частот аллелей и генотипов полиморфизма *rs 231775* гена *CTLA-4* среди больных СД1 в сочетании с АИЗ ЩЖ и доноров не выявил статистически значимых различий. Анализ распределения частот аллелей и генотипов полиморфизма *rs 231775* гена *CTLA-4* выявил повышение встречаемости «редкого» аллеля G среди больных с изолированным СД1–148/268 (55%), по сравнению с пациентами, страдающими СД1 в сочетании с АИЗ ЩЖ, – 103/220 (46,8%) (OR=2,29, 95% CI: 1,39–3,77,  $p=0,0016$ ).

Частота носителей «редкого» аллеля G у больных с изолированным СД1 была достоверно выше – 57/70 (81%), чем в группе СД1+АИЗ ЩЖ – 33/60 (55%), OR=3,59, 95% CI: 1,63–7,89,  $p=0,0022$ . При этом частота генотипа GG недостоверно выше в группе пациентов (34%) по сравнению с группой контроля (20%),  $p=0,11$ , OR=1,7, 95% CI: 0,94–3,13. Оценочный тест для анализа изменения степени ассоциации между генотипом *CTLA-4 rs 231775* и определенной клинической формой СД1, в зависимости от числа полиморфных аллелей

(тренд-тест Кохрана-Армитажа) показал статистически значимые различия между сравниваемыми генотипами ( $p=0,002$ ), что свидетельствует о наличии тенденции к высокой степени ассоциации генотипа данного полиморфизма с клинической формой СД1.

**Выводы.** Таким образом, нами получена высоко достоверная ассоциация полиморфизма *rs 2476601* гена *PTPN22* с повышенным риском развития сочетания СД1 и АИЗ ЩЖ ( $p=0,006$ ). При этом аллель T и генотипы ST и TT являются факторами высокого риска развития АПС 3а типа – клинического варианта СД1.

В то же время, изолированный СД1 ассоциирован с G (GG) в *rs 231775* гена *CTLA-4* ( $p=0,0116$ ). При этом мы не получили доказанную ассоциацию этого полиморфизма с СД1 в сочетании с АИЗ ЩЖ. Пациенты, имеющие сочетание СД1 с АИЗ ЩЖ, по распределению аллелей и генотипов полиморфизма *rs 231775* ближе к норме по сравнению с пациентами с изолированным СД1.

Варианты сочетаний генотипов полиморфизмов генов *PTPN22* и *CTLA-4* определяют степень предрасположенности к развитию изолированного СД1 или СД1 в сочетании с АИЗ ЩЖ, а также особенности течения аутоиммунного воспаления при АИЗ.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абрамов Д. Д., Дедов И. И., Трофимов Д. Ю., Болдырева М. Н., Кураева Т. Л., Алексеев Л. П. Сахарный диабет. – 2007. – № 3. – С. 5–8.
2. Репина Е. А. Сахарный диабет. – 2011. – № 2. – С. 23–31.
3. Репина Е. А., Степанова Е. Н., Зверева Я. С., Трошина Е. А., Прокофьев С. А., Шестакова М. В., Дедов И. И. Российский аллергологический журнал. – 2012. – № 5. – вып. 1. – С. 222–224
4. Foustieri G., Liossis S. N., Battaglia M. Clin. Immunol. – 2013. – 149. – P. 556–65
5. Salmond R. J., Brownlie R. J., Morrison V. L., Zamovska R. Nat. Immunol. – 2014. – 15. – P. 875–83

## TYPE 1 DIABETES MELLITUS AND AUTOIMMUNE POLYGLANDULAR SYNDROMES – IMMUNOGENETIC RELATIONS

<sup>1</sup>Repina E. A., <sup>2</sup>Boldyreva M. N., <sup>1</sup>Suntsov Y. I., <sup>1</sup>Troshina E. A.,  
<sup>1</sup>Shestakova M. V., <sup>1</sup>Dedov I. I.

<sup>1</sup>FGBU "Endocrinology Research Centre" The Ministry of Health;

<sup>2</sup>FGBU "Institute of Immunology" FMBA of Russia, Moscow, Russia

A comparative analysis of the distribution of alleles and genotypes frequencies of the gene *PTPN22* polymorphism *rs 2476601* and *CTLA-4* gene polymorphism *rs 231775* was taken in 249 patients with type 1 diabetes mellitus (T1DM): 138 patients with isolated T1DM and 111 patients with T1DM in combination with autoimmune thyroid diseases (AIThD). The control group consisted of 108 blood donors without autoimmune diseases (AID) and family history on them. Highly significant association of *PTPN22* gene polymorphism *rs 2476601* with increased risk of T1DM in combination with AIThD ( $p=0,006$ ) was determined. In this case, the *T* allele and genotypes *CT* and *TT* are high risk factors of autoimmune polyglandular syndrome type 3a – clinical variant of T1DM. At the same time, isolated T1DM was associated with *G* (*GG*) at *rs 231775* *CTLA-4* gene ( $p=0,0116$ ). In this case we did not get a proven association of this polymorphism with T1DM in conjunction with AIThD. The distribution of alleles and genotypes of *CTLA-4* gene polymorphism *rs 231775* in patients with T1DM in combination with AIThD is closer to normal in comparison with isolated T1DM patients. Variants of combinations of genotypes *PTPN22* and *CTLA-4* genes' polymorphisms determine the degree of predisposition to the development of isolated T1DM or T1DM in conjunction with AIThD, as well as peculiarities of autoimmune inflammation in AID.

---

---

## МАРКЕРЫ АПОПТОЗА И КИСЛОРОДЗАВИСИМЫЙ МЕТАБОЛИЗМ МОНОЦИТОВ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ФОРМАХ КРАСНОЙ ВОЛЧАНКИ

Романова Н. В., Ерыгина Е. Н., Романов В. А.,  
Капрельянц Е. Ю.

ГБОУ ВПО Ярославский государственный медицинский университет,  
Ярославль, Россия

Исследование апоптоза моноцитов и их кислороднезависимого метаболизма у больных кожной красной волчанкой и системной красной волчанкой демонстрирует увеличение маркеров апоптоза клеток исключительно при СКВ и связь этого процесса с активацией моноцитов и повышением продукции активных форм кислорода.

*Ключевые слова:* провоспалительные цитокины, маркеры апоптоза моноцитов, красная волчанка.

**Актуальность.** Проблема взаимоотношений кожных и системных форм красной волчанки представляется весьма актуальной как с точки зрения выяснения механизмов развития этих болезней, с целью установления общности и различий в их патогенезе, так

и в практическом плане для осуществления диагностических мероприятий и поиска мишеней для лечения.

Данные литературы [1] свидетельствуют об изменении маркеров апоптоза нейтрофилов (Нф) и о связи этих маркеров с мета-

болическими функциями нейтрофильных гранулоцитов, преимущественно кислород-зависимого характера, у больных системной красной волчанкой (СКВ). В гораздо меньшей степени изучены маркеры апоптоза и функциональное состояние моноцитов не только при СКВ, но и при ее кожной форме – дискоидной красной волчанке (ДКВ), а также зависимость программируемой гибели циркулирующих фагоцитов от активности протекающих в них процессов кислородзависимого метаболизма.

**Цель работы:** изучение показателей апоптоза моноцитов (Мн), а также их кислород-независимого метаболизма у больных дискоидной красной волчанкой (ДКВ) и системной красной волчанкой (СКВ).

**Используемые методы.** Обследован 121 человек в возрасте от 20 до 60 лет (54 больных СКВ, 34 – ДКВ, 33 здоровых лица). Исследовали экспрессию CD95 антигена на Мн с помощью метода непрямой иммунофлюоресценции, а также ДНК клеток по данным изучения сродства красителя акридинового оранжевого к дезоксирибонуклеопротеиду (ДНП) клеток микроцитометрическим методом [4]. Кислородзависимый метаболизм нейтрофилов оценивали методом спонтанной и индуцированной хемилюминесценции (сХЛ, иХЛ). Статистическая обработка данных проведена с помощью программного пакета Statistica 10.0 (StatSoft, Inc.); для исследования взаимосвязи изученных показателей применен корреляционный анализ по Спирмену [2].

**Основные результаты.** Установлено, что при СКВ количество CD95<sup>+</sup> положительных Мн было статистически достоверно выше

(79,6±4,32%), чем у здоровых лиц (52,3±3,32%,  $p<0,05$ ). У больных ДКВ количество CD95<sup>+</sup> Мн существенно не отличался от результатов здоровых лиц (55,3±3,32%,  $p>0,05$ ). Только при СКВ констатировано достоверное снижение ДНК в Мн в сравнении с данными пациентов с ДКВ и здоровых лиц (5,56±2,45 mV, у доноров – 8,36±1,55 mV,  $p<0,05$ , при ДКВ – 8,85±2,42 mV,  $p>0,05$ ). С нарастанием активности СКВ установлено уменьшение содержания ДНК в Мн (с 5,28±1,67 до 4,25±2,2 mV,  $p<0,05$ ). Констатировано увеличение спонтанной продукции активных форм кислорода в сХЛ Мн (2,1±1,8×10<sup>4</sup> имп/мин) со снижением резервных функций Мн по сравнению с данными здоровых лиц (0,7±0,3×10<sup>4</sup> имп/мин,  $p<0,05$ ) только при СКВ. Анализ взаимосвязей исследованных показателей показал наличие прямой корреляционной связи между ДНК Мн и индуцированной ХЛ Мн при СКВ.

Полученные данные указывают на увеличение маркеров апоптоза Мн исключительно при СКВ и на связь этого процесса с активацией кислородзависимого метаболизма этих клеток с повышением продукции активных форм кислорода при этом заболевании. Полученные данные могут быть использованы в качестве дополнительного лабораторного теста для дифференциации СКВ и ДКВ.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ильин М. В. и др. Уральский медицинский журнал. – 2010. – № 1 (66). – С.88-91.
2. Гланц С. Медико-биологическая статистика. М., Практика, 1998.
3. Карнаухов В. Н. Люминесцентный анализ клеток. Пуцзино: 2002.

### OXYDATIVE STRESS AND METABOLIC MARKERS OF APOPTOSIS OF MONOCYTES IN VARIOUS FORMS OF LUPUS ERYTHEMATOSUS

Romanova N. V., Erygina E. N., Romanov V. A., Kaprelanc E. Yu.

State Medical University, Yaroslavl, Russia

Study of apoptosis of monocytes and their oxidative stress in patients with cutaneous lupus erythematosus (CLE) and systemic lupus erythematosus (SLE) demonstrates increased markers of apoptosis of cells exclusively in SLE and the relationship of this process with the activation of monocytes and increase of reactive oxygen species production.

*Key words:* proinflammatory cytokines, markers of apoptosis of monocytes, lupus erythematosus.

## ОСОБЕННОСТИ ФОРМИРОВАНИЯ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ЛОВУШЕК НЕЙТРОФИЛАМИ БОЛЬНЫХ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 2 ТИПА

Тарабрина Ю. О., Долгушин И. И., Колесников О. Л.,  
Колесникова А. А., Маркова В. А.

ГБОУ ВПО Южно-Уральский государственный медицинский университет  
Минздрава России, Челябинск, Россия

Обследованы 236 человек, среди которых выделяли группы практически здоровых лиц, пациентов с гипертонической болезнью и ИБС, больных сахарным диабетом 2 типа. Результаты свидетельствуют, что сахарный диабет 2 типа увеличивает способность нейтрофилов к образованию внеклеточных ловушек. При СД 2 типа, осложненным синдромом диабетической стопы, отмечается уменьшение доли нейтрофилов, формирующих внеклеточные ловушки. Возраст, наличие гипертонической болезни и ИБС не влияют на способность нейтрофилов формировать внеклеточные ловушки.

*Ключевые слова:* нейтрофил, внеклеточные ловушки, сахарный диабет.

**Актуальность и цель работы.** Сахарный диабет (СД) является одной из важнейших проблем современной медицины, что непосредственно связано с крайне высокой частотой встречаемости данной патологии. Численность больных сахарным диабетом в мире к концу 2014 года составила 387 миллионов человек. К 2035 году этой патологией будут страдать 592 миллиона человек. В Российской Федерации по данным Государственного регистра больных сахарным диабетом на январь 2015 года насчитывалось 4,04 миллиона человек, из которых СД 2 типа страдали 3,7 миллиона [3]. СД влияет на все стороны жизнедеятельности, изменяя и функции иммунной системы. Пациенты, страдающие СД, являются иммуноскомпрометированными, о чем говорит повышенная чувствительность к инфекционным заболеваниям. При изучении когорты больных СД 2 типа показано, что отношение рисков для инфекционных болезней, связанных с госпитализацией, составило 2,15. СД в 3 раза увеличивает риск госпитализации при гриппе А (H1N1) и в 4 раза увеличивает риск помещения в палату интенсивной терапии после госпитализации [5]. У больных СД 2 типа, имеющих тяжелые осложнения, диабета повышены способность моноцитов к выработке активных форм кис-

лорода и способность нейтрофилов к поглощению чужеродных частиц [4]. При СД 2 типа почти в 3 снижается экспрессия нейтрофилами молекулы адгезии CD11b, а при развитии синдрома диабетической стопы уменьшается экспрессия CD11b и CD62L [1]. Однако формирование внеклеточных ловушек остается слабо изученным, в связи с чем целью настоящей работы явилась оценка способности к формированию внеклеточных ловушек нейтрофильными гранулоцитами больных СД 2 типа.

**Используемые методы.** При проведении работы было обследовано 236 человек. В группу «СД» вошло 111 пациентов с СД 2 типа. Группу «СДС» составили 14 больных СД 2 типа, страдающих синдромом диабетической стопы. В группу сравнения включили 14 пациентов без нарушения углеводного обмена, страдающих артериальной гипертензией и/или ИБС. Такой выбор обусловлен состоянием пациентов с СД2, у которых также диагностировали ИБС и/или артериальную гипертензию. Дополнительно было обследовано 60 клинически здоровых лиц. Способность нейтрофилов к формированию внеклеточных ловушек оценивали в цельной крови и в чистой фракции нейтрофилов по описанному ранее методу [2]. Реакцию ставили в спонтанном вари-

анте и при стимуляции клеток пирогеналом. Результат выражали в виде процента клеток, сформировавших внеклеточные ловушки, рассчитанного от общего количества нейтрофилов. Данные обрабатывали с помощью пакета прикладных статистических программ SPSS и представляли в виде медианы, первого и третьего квартилей. Достоверность различий между группами определяли с помощью непараметрических критериев Манна-Уитни и Колмогорова-Смирнова. Различия считали достоверными при  $p \leq 0,05$ .

**Основные результаты.** Данные по цельной крови. При спонтанной реакции в группах сравнения и «СД» ловушки формировало практически одинаковое количество нейтрофилов: 1,00 [0; 2,0] и 1,00 [1,00; 3,00]. При наличии СДС активность статистически значимо снижалась относительно групп сравнения и «СД» и составила 0 [0; 1,00]. После стимуляции пирогеналом ситуация осталась прежней и различий между группами сравнения и «СД» не обнаружено. Процентное содержание внеклеточных ловушек составило 1,0 [0; 2,25] и 1,50 [1,0; 3,25] соответственно. В группе «СДС» показатель оставался достоверно ниже, чем в группах сравнения и «СД».

Данные по чистой фракции нейтрофилов. Без дополнительного стимула в группе сравнения внеклеточные ловушки формировало 4,00 [2,00; 12,00] процентов нейтрофилов. СД 2 типа сопровождался активацией данной функции клеток. Доля нейтрофилов, формировавших ловушки, составила 10,00 [6,00; 22,00] ( $P = 0,001$ ). Наличие СДС уменьшило способность к образованию внеклеточных ловушек до уровня 6,00 [2,00; 12,00]. При этом различия с группой «СД» были статистически значимыми ( $P = 0,022$ ). Стимуляция пирогеналом приводила к резкому увеличению доли клеток, формирующих ловушки, и в группе сравнения показатель составил 16,00 [10,00; 30,00]. На фоне наличия СД внеклеточные ловушки продуцировало 26,00 [14,00; 44,00] процентов нейтрофилов, что статистически значимо превышало активность клеток в группе сравнения ( $P = 0,007$ ). В группе «СДС» внеклеточные ловушки формировало 18,00 [16,00; 28,00] процентов клеток, различия с группами сравнения и «СД» были недостоверными.

Медиана возраста в группах сравнения и «СД» составила 66 лет и 62,5 года соот-

ветственно. Для оценки влияния возраста, гипертонической болезни, ИБС и СД на функции нейтрофилов дополнительно обследовали 60 клинически здоровых лиц, возраст которых колебался от 18 до 35 лет. При изучении цельной крови здоровых лиц в спонтанном и стимулированном вариантах доля клеток, образующих ловушки, была одинакова, и составила 1,0 [1,0; 2,0]. Различий с группами сравнения и «СД» не выявлено. При исследовании чистой фракции нейтрофилов ловушки формировало 4,0 [3,0; 6,0] процентов нейтрофилов. При стимуляции пирогеналом этот показатель составил 16,5 [12,75; 20,0]. Различия с группой сравнения отсутствовали. Однако активность нейтрофилов здоровых лиц при обоих вариантах реакции была статистически ниже, чем в группе «СД» ( $P = 0,001$ ).

#### Выводы:

1. СД 2 типа усиливает способность нейтрофилов к образованию внеклеточных ловушек.
2. При СД 2 типа, осложненным синдромом диабетической стопы, отмечается уменьшение доли нейтрофилов, формирующих внеклеточные ловушки.
3. Такие факторы, как возраст, наличие гипертонической болезни и ИБС не влияют на способность нейтрофилов к формированию внеклеточных ловушек.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Долгушин И. И., Тарабрина Ю. О., Колесников О. Л. и др. // Современные проблемы науки и образования. – 2014. – № 5. Электронная публикация, режим доступа: <http://www.science-education.ru/119-15228>
2. Долгушин, И. И. Нейтрофильные ловушки и методы оценки функционального статуса нейтрофилов / И. И. Долгушин, Ю. С. Андреева, А. Ю. Савочкина. – Москва: Издательство РАМН, 2009. – 207 с.
3. Клинические рекомендации «Алгоритмы специализированной медицинской помощи больным сахарным диабетом», 7-й выпуск // Сахарный диабет. – 2015. – № 1. – 112 с.
4. Колесникова А. А., Долгушин И. И., Тарабрина Ю. О. и др. // Проблемы эндокринологии. – 2012. – № 4–2. – С. 27.
5. Lecube A., Pacho G., Petriz J. et al. // PLOS ONE. – 2011. – Vol. 6, Issue 8. – e23366. Электронная публикация, режим доступа: <http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0023366>.

## SPECIFIC FEATURES OF EXTRACELLULAR TRAP FORMATION IN NEUTROPHILS OF DIABETES MELLITUS TYPE 2 PATIENTS

Tarabrina Yu.O., Dolgushin I.I., Kolesnikov O.L.,  
Kolesnikova A.A., Markova V.A.

*State Educational Institution of Higher Professional Education "South Ural State Medical University" Ministry of Health of the Russian Federation, Chelyabinsk, Russia*

The study compares three groups of people, one of them forms a control group of healthy people, the second one consists of both hypertension and cardiac ischemia patients, and the third one consists of diabetes mellitus type 2 patients, overall number of examined was 236. The results show the increase of extracellular trap formation ability in neutrophils of only diabetes mellitus type 2 patients group. But in case of diabetes mellitus type 2 that was complicated with diabetic foot manifestation the diminished proportion of neutrophil extracellular trap formation ability was registered. Other factors, such as hypertension, cardiac ischemia or patient age had no influence on neutrophil extracellular trap formation ability.

---

## ГЕОЭКОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ В РАЗВИТИИ АУТОИММУННОГО САХАРНОГО ДИАБЕТА

Фархутдинов И. М.<sup>1,3</sup>, Фархутдинова Л. М.<sup>2</sup>

*<sup>1</sup>Башкирский государственный университет; <sup>2</sup>Башкирский государственный медицинский университет; <sup>3</sup>Институт геологии Уфимского научного центра РАН, Уфа, Россия*

Показана взаимосвязь развития аутоиммунного сахарного диабета с геоэкологическими условиями местности проживания. Распространенность заболевания оказалась ниже в южной части республики – в предгорьях Южного Урала. Выявлена более благополучная ситуация среди проживающих в зоне залегания известняков, что, по-видимому, обусловлено благоприятным влиянием состава элементов-примесей карбонатных пород. Обоснована целесообразность расширения исследований роли геоэкологических факторов и микроэлементного статуса природной среды в развитии аутоиммунного сахарного диабета.

*Ключевые слова:* сахарный диабет 1-го типа, аутоиммунный сахарный диабет, геоэкология, микроэлементы, медицинская геология.

Сахарный диабет 1-го типа (СД1) – одна из наиболее актуальных медико-социальных проблем в связи с ранней инвалидизацией и высокой смертностью больных. В мире насчитывается около 20 млн. больных СД1 и количество их увеличивается ежегодно в среднем на 5%. В России распространенность СД1 составляет более 200 на 100 000 населения.

В настоящее время установлен аутоиммунный генез СД1, при этом антитела к ткани поджелудочной железы, или иммунологические маркеры диабета, выявляются за несколько лет до манифестации заболевания. Однако причины аутоиммунной агрессии с деструк-

цией бета-клеток поджелудочной железы и развитием инсулиновой недостаточности неизвестны.

По современным представлениям СД1 – многофакторное заболевание, развивающееся под воздействием внешней среды на фоне генетической предрасположенности. Среди факторов внешней среды важная роль в развитии диабета принадлежит местности проживания, о чем свидетельствуют результаты эпидемиологических исследований: распространенность СД1 в странах мира широко варьирует, при этом минимальные и максимальные показатели отличаются в 60 раз. Кроме

того, подтверждением роли среды проживания в развитии СД1 является изменение распространенности заболевания среди популяции при ее миграции [3, 5].

В связи с этим большой интерес представляет проблема взаимосвязи региональных геоэкологических условий местности проживания и СД1, изученность которой крайне мала.

Целью исследования стало изучение закономерностей распространенности СД1 в Республике Башкортостан. Предпосылкой к данному исследованию явились научные результаты, показавшие значимость геоэкологических факторов в развитии таких аутоиммунных заболеваний, как диффузный токсический зоб, аутоиммунный тиреоидит, рассеянный склероз на территории Республики Башкортостан. Исследования, проведенные в Башкортостане, установили также взаимосвязь частоты выявления повышенного титра тиреоидных антител с региональными особенностями микроэлементного статуса местности проживания и организма человека [1, 4]. Изучению влияния геоэкологических факторов на здоровье населения в Башкортостане благоприятствует уникально широкое разнообразие хорошо изученных геологических условий на территории республики.

Для реализации поставленной цели проведен сравнительный анализ распространенности СД1 в Республике Башкортостан за 2009–2013 годы в различных районах в зависимости от геоэкологических особенностей местности. Использованы данные Медицинского информационно-аналитического центра Министерства здравоохранения Республики Башкортостан (МИАЦ МЗ РБ) (руководитель Государственного регистра больных СД – к.м.н. Г.Г. Байбурина). Статистическая обработка полученных данных проводилась с использованием пакета прикладных программ Statistica for Windows V. 6.0. Критический уровень значимости принимался равным 0,05.

По результатам анализа, средняя распространенность СД1 в Башкортостане составила 112 на 100 000 населения, вместе с тем обнаружены значительные колебания показателя (в 5 раз) в районах республики – от 36 до 182 на 100 000 жителей.

Обращает на себя внимание более благоприятная ситуация в южной части Башкортостана, где средняя распространенность СД1 составила 100 на 100 000, в то время как в се-

верных районах – 117 на 100 000 населения ( $p < 0,01$ ). Полученные результаты согласуются с общей тенденцией в странах мира, заключающейся в увеличении распространенности СД1 по направлению с юга на север.

Следует отметить благоприятное влияние на анализируемый показатель Южного Урала, в предгорьях которого распространенность СД1 не превышала 64–98 случаев на 100 000 жителей.

Влияние геоэкологических условий местности, по-видимому, обусловлено особенностями микроэлементного статуса, поскольку горные породы являются главным источником минералов, в том числе в организме человека. Взаимосвязь региональных особенностей микроэлементного состава организма человека и местности проживания установлена исследованиями, проведенными в начале 2000-х годов в Республике Башкортостан [4].

Для более детального изучения влияния геоэкологических условий на развитие аутоиммунного сахарного диабета проведена сравнительная оценка распространенности заболевания в населенных пунктах, расположенных в зоне залегания песчаников и известняков, характеризующихся различным составом элементов-примесей. Проанализирована ситуация по СД1 в населенных пунктах, удаленных от промышленных центров и вредных производств, что исключило техногенное влияние окружающей среды, а также имеющих сходство национального состава населения, что позволило нивелировать генетический фактор.

Было исследовано 14 населенных пунктов, расположенных среди известняков с общим населением 20792 человек, и 13 – в зоне развития песчаников, где общее количество жителей составило 38737 человек (7 районов Урала и Приуралья). По результатам анализа, распространенность аутоиммунного диабета у проживающих на территории преимущественного развития известняков оказалась ниже и составила 119 на 100 000 населения, в то время как у жителей населенных пунктов, где подстилающие породы сложены песчаниками – 163 на 100 000 ( $p < 0,01$ ). Следует подчеркнуть, что в 6 из 14 исследованных населенных пунктов, расположенных в зоне залегания известняков с общей численностью населения 9689 человек, случаи СД1 не зарегистрированы.



По сравнению с песчаниками карбонатные породы (известняки) содержат в 9,7 раза больше кальция и меньшее (от 1,5 до 10 раз) количество других элементов-примесей. Полученные данные позволяют сделать вывод о благоприятном влиянии кальций-содержащих пород на распространенность аутоиммунного диабета.

На основании полученных результатов можно предполагать, что особенности микроэлементного статуса природной среды, обусловленные геоэкологическими условиями местности проживания, влияют на состояние иммунной системы организма человека и, по-видимому, способны провоцировать активацию аутоиммунного процесса с повреждением инсулинпродуцирующих клеток поджелудочной железы.

Результаты проведенного исследования свидетельствуют о перспективности дальнейшего углубленного изучения роли геологической среды и микроэлементного статуса в развитии аутоиммунного сахарного диабета. Целесообразность такого исследования обоснована также накопившимися за последние десятилетия сведениями о значимости целого ряда микроэлементов в регуляции углеводного обмена и функционировании иммунной системы [2]. Данное инновационное направление открывает возможность новых подходов в решении одной из сложных и острых проблем – аутоиммунного сахарного диабета.

**Вывод.** Распространенность аутоиммунного сахарного диабета связана с геоэкологическими факторами местности проживания. Территория с наиболее благоприятной ситуацией по СД1 в Республике Башкортостан приурочена к предгорьям Южного Урала. Зоны развития известняков характеризуются меньшей распространенностью СД1, что связано с особенностями элементного состава пород. Целесообразно углубленное изучение роли микроэлементного статуса природной среды в развитии аутоиммунного сахарного диабета. Исследование на стыке медицины и геоэкологии является фундаментальным направлением, открывающим новые перспективы в решении проблемы сахарного диабета 1-го типа.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бахтиярова К. З., Фархутдинова Л. М., Магжанов Р. В. Экология. 2007. № 9. С. 3.
2. Кудрин А. В., Громова О. А. Микроэлементы в иммунологии и онкологии. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2007; 543 с.
3. Петеркова В. А. // Фарматека. 2012. № 3 (236). С. 67-74.
4. Фархутдинова Л. М. Региональные особенности микроэлементного статуса в развитии тиреоидной и соматической патологии: автореф. дис. ... д-ра мед. наук. Челябин. гос. мед. академия, Челябинск. 2007.
5. Фархутдинова Л. М., Байбурина Г. Г., Фархутдинов И. М. // Медицинский вестник Башкортостана. 2010. Т. 5, № 4. С. 15-19.

### GEOECOLOGICAL FACTORS IN THE DEVELOPMENT OF AUTOIMMUNE DIABETES

Farkhutdinov I. M.<sup>1,3</sup>, Farkhutdinova L. M.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Bashkir State University, Ufa; <sup>2</sup>Bashkir State Medical University, Ufa; <sup>3</sup>Institute of Geology of the Ufimian Scientific Centre RAS, Ufa, Russia

The article describes the interrelation of autoimmune diabetes with geoecological conditions of the area of residence. Prevalence was lower in the southern part of the republic – in the foothills of the Southern Urals. It is shown a good situation among residents in the area of limestone, which is apparently due to the favorable effect of impurity elements of carbonate rocks. It is advisable to expand research on the role of geoecological factors and trace element status of the environment in the development of autoimmune diabetes.

*Keywords:* diabetes type 1, autoimmune diabetes, geoecology, trace elements, medical geology.

## ИММУНОПАТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ САХАРНОГО ДИАБЕТА 2-го ТИПА

Фархутдинова Л. М.

*Башкирский государственный медицинский университет, Уфа, Россия*

Результаты исследования антител к панкреатической ткани и фенотипирования лимфоцитов при сахарном диабете 2-го типа свидетельствуют о роли иммунного компонента в развитии заболевания. Прямая связь титра антител с уровнем инсулина, индексом массы тела и более длительным периодом инсулинпродуцирующей функции бета-клеток при серопозитивном сахарном диабете 2-го типа отражает значимость антителообразования в развитии гиперинсулинемии и инсулинорезистентности.

*Ключевые слова:* сахарный диабет, аутоиммунный диабет взрослых, иммунологические маркеры диабета, иммунопатогенез диабета.

Сахарный диабет (СД) – острейшая медико-социальная проблема современности: в настоящее время во всем мире насчитывается более 380 млн. больных СД, по оценкам экспертов к 2035 г. этот показатель составит около 600 млн., из них 90% – пациенты с СД 2-го типа. В структуре смертности СД занимает четвертое место после сердечно-сосудистой, онкологической патологии и травм.

По современным представлениям, СД 2-го типа – гетерогенное заболевание, развивающееся при взаимодействии факторов внешней среды и генетической предрасположенности. В отличие от СД 1-го типа, характеризующегося абсолютным дефицитом инсулина в результате аутоиммунной деструкции бета-клеток поджелудочной железы, СД 2-го типа в большинстве случаев развивается на фоне ожирения вследствие инсулинорезистентности и относительной недостаточности инсулина. Последняя имеет место при уменьшении массы инсулинпродуцирующих клеток на 50% [1, 2, 3, 5].

В 10-25% случаев СД 2-го типа через 1-3 года приобретает признаки СД 1-го типа с выраженным дефицитом инсулина и потребностью в заместительной инсулинотерапии. Данный тип заболевания получил название аутоиммунного диабета взрослых (ADA), лабораторным критерием диагностики которого является обнаружение в крови иммунологических маркеров – антител к различным компонентам панкреатической ткани [1, 2, 5].

Вместе с тем исследования последних лет показали, что СД 2-го типа в 40–50% случаев сопровождается повышением образования антител к островковой ткани поджелудочной железы и их патогенетическая значимость требует уточнения.

**Цель исследования** – выявить иммунопатогенетические особенности СД 2-го типа. С этой целью проведено обследование 61 пациента с СД 2-го типа в дебюте заболевания, средний возраст –  $(44,6 \pm 0,5)$  года. Проведено 10-летнее проспективное исследование течения СД 2-го типа в зависимости от выявления иммунологических маркеров. Контрольную группу, сопоставимую по возрасту и гендерным особенностям, составили 44 человека. Диагноз СД устанавливался на основании клинического обследования и исследований уровня гликемии. Определялся уровень базального С-пептида (0,3–3,7 нг/мл, здесь и далее в скобках указан референсный интервал) и инсулина натощак (5–20 мкЕд/мл) радиоиммунным методом с использованием реактивов ВСМ Diagnostics (США). Проведен расчет индекса массы тела (ИМТ,  $18\text{--}25 \text{ кг/м}^2$ ) и индекса инсулинорезистентности (НОМА – Homeostasis Model Assessment, до 6,0) по формуле:  $\text{НОМА} = [\text{базальный инсулин (мкЕд/мл)} \cdot \text{глюкоза крови натощак (ммоль/л)}]: 22,5 \text{ (ед.)}$ .

Изучены уровни антител к островковым клеткам (ICA-islet-cell antibodies – ICA, 0-0,26 Ед/мл), глутаматдекарбоксилазе (GADA-glutamic acid decarboxylase autoantibodies –

GADA, 0–1,05 Ед/мл) методом иммуноферментного анализа с использованием наборов BCM Diagnostics (США), а также антител к инсулину (IAA-insulin autoantibodies – IAA, 0–10,0 Ед/мл) с помощью наборов Orgentec (Германия) на ИФА-анализаторе Personal LAB (Adaltis, Италия). Проведено иммунофенотипирование лимфоцитов методом проточной цитофлуориметрии на приборе EPICS XL4 Beckman Coulter (США). Определяли содержание Т- (CD3<sup>+</sup>CD19<sup>-</sup>) и В-клеток (CD3<sup>-</sup>CD19<sup>+</sup>), Т-хелперов (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>), Т-цитотоксических лимфоцитов (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>), иммунорегуляторный индекс (IRI, CD4/CD8), количество естественных киллерных клеток (NK-клеток, CD3<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>), активированных NK (CD3<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>), Т-активированных (CD3<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>) и Т-NK-клеток (CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>).

Статистическая обработка полученных данных проводилась с использованием пакета прикладных программ Statistica for Windows V. 6.0, AtteStat Microsoft Excel. Критический уровень значимости принимался равным 0,05.

По результатам проведенного исследования у больных СД 2-го типа в дебюте заболевания (n=61) иммунологические маркеры СД обнаружены в 47,5% случаев (n=29), среди них GADA – 75,0%; ICA – 60,7%; IAA – 25,0%. Следует отметить, что GADA обнаруживались с наибольшей частотой.

Выявление иммунологических маркеров диабета характерно для аутоиммунного диабета взрослых, одним из клинических признаков которого является отсутствие избыточной массы тела в дебюте заболевания в отличие от СД 2-го типа. Однако проведенное нами исследование показало, что серопозитивный СД 2-го типа по сравнению с серонегативным СД 2-го типа характеризовался более высоким ИМТ – (29,3±6,3) кг/м<sup>2</sup> против (26,6±4,3) кг/м<sup>2</sup>, (p=0,0476), и уровнем инсулина – 22,3 (17,2; 31,65) против 16,15 (13,15; 18,55) мкЕд/мл (p=0,0394).

Наблюдение за больными СД 2-го типа в течение 10 лет также обнаружило парадоксальный результат. Оказалось, что у подавляющего большинства больных с серопозитивным СД 2-го типа (75,9%) в течение всего периода наблюдения заболевание компенсировалось применением пероральных сахароснижающих препаратов, в то время как потребность в инсулине в течение первых трех лет развилась в 24,1% случаев, что соответствовало аутоим-

мунному диабету взрослых. В группе больных серонегативным СД 2-го типа, напротив, инсулинопотребность через 3 года возникла у 46,9% пациентов, что в 1,9 раза выше по сравнению с аналогичным показателем в серопозитивной группе (p=0,0345).

Результаты иммунофенотипирования лимфоцитов при СД 2-го типа выявили повышение относительного числа лимфоцитов на 29,0% по сравнению с контрольной группой (p=0,0059). Наиболее выраженные изменения обнаружены в количестве естественных киллерных клеток: увеличение абсолютного количества NK-клеток на 42,2% (p=0,0362), абсолютного и относительного числа Т-NK-клеток (CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>) на 45,6% (p=0,0199) и 92,9% (p=0,0084), соответственно, а также уровня активированных NK-клеток (CD3<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>) на 4,8% (p=0,0137) по сравнению с контрольной группой. Корреляционный анализ обнаружил достоверно значимую прямую связь между числом NK-клеток (CD3<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>) и относительным количеством В-лимфоцитов (R=+0,669, p=0,0345), что согласуется со сведениями научной литературы об антителообразующей клеточной цитотоксичности натуральных киллеров [4]. Увеличение количества клеток с цитотоксическими свойствами при СД 2-го типа, по-видимому, обуславливает уменьшение массы бета-клеток и манифестацию диабета.

Выявленное повышение антителообразования при СД 2-го типа, связанное с более высоким показателем массы тела и инсулина в дебюте заболевания по сравнению с серонегативным СД 2-го типа, свидетельствует о значимости иммунологического компонента в развитии заболевания. Как известно, впервые способность антител стимулировать функцию эндокринного органа была установлена на примере такого аутоиммунного заболевания как диффузный токсический зоб. Логично предположить, что антитела к тканям поджелудочной железы, в частности GADA, способны стимулировать функциональную активность бета-клеток, что имеет как компенсаторное, так и патологическое значение. Компенсаторная роль заключается в активации инсулинпродуцирующих клеток, что отражает взаимосвязь антителообразования с более длительной сохранностью инсулинпродуцирующей функции поджелудочной железы по данным проспективного исследо-

вания. Патологическое значение стимуляции бета-клеток заключается в развитии гиперинсулинемии, усугубляющей инсулинорезистентность – основного механизма формирования СД 2-го типа.

**Вывод.** Выявление при СД 2-го типа иммунологических маркеров диабета и лимфоцитов с цитотоксическими свойствами свидетельствует о наличии иммунного компонента в развитии заболевания. Повышенный уровень антител к ткани поджелудочной железы при серопозитивном СД 2-го типа, связанный с более высоким ИМТ, уровнем инсулина, а также с более продолжительной сохранностью инсулинпродуцирующей функции бета-клеток по сравнению с серонегативным

СД 2-го типа, отражает значимость антителообразования в развитии гиперинсулинемии и инсулинорезистентности.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Смирнова О. М. // Проблемы эндокринологии. 2008. Т. 54, № 2. С. 3–7.
2. Фархутдинова Л. М., Байбурина Г. Г. // Российский иммунологический журнал. 2014. Т. 8 (17), № 3. С. 610–612.
3. Фархутдинова Л. М., Байбурина Г. Г., Фархутдинов И. М. // Вестник Академии наук Республики Башкортостан. 2010. Т. 15, № 3. С. 32–39.
4. Черешнев В. А., Давыдов В. В. Патология. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. с. 1248.
5. Whiting DR, Guariguata L, Weil C, Shaw J. // Diabetes research and clinical practice. 2011; 94 (3):311–321.

### IMMUNOPATHOGENETIC ASPECTS OF TYPE 2 DIABETES

Farkhutdinova L. M.

*Bashkir State Medical University, Ufa, Russia*

Results of the study of antibodies to pancreatic tissue and phenotyping of lymphocytes in Type 2 diabetes suggest a role for immune component in the development of the disease. Direct relationship between the antibody titer and levels of insulin, body mass index and longer duration of insulin function of beta cells in seropositive Type 2 diabetes reflects the significance of antibody in the development of insulin resistance and hyperinsulinemia.

*Key words:* diabetes mellitus, autoimmune diabetes in adults, immunological markers of diabetes mellitus, immunopathogenesis of diabetes.

### РОЛЬ РЕВМАТОИДНОГО ФАКТОРА В ГИБЕЛИ CD4<sup>+</sup>ЛИМФОЦИТОВ У КРЫС, ИММУНИЗИРОВАННЫХ GR120 ГЛИКОПРОТЕИНОМ ВИЧ-1

**Храмова Т. В., Бедулева Л. В., Березкина С. Ю.,  
Меньшиков И. В.**

*ФГБОУ ВПО «Удмуртский государственный университет»,  
Ижевск, Россия*

Известно, что развитие иммунодефицита при ВИЧ инфекции является результатом истощения CD4<sup>+</sup> лимфоцитов. Несмотря на то, что прямое цитопатическое влияние ВИЧ на CD4<sup>+</sup>клетки вносит вклад в их истощение, большинство из гибнущих при ВИЧ инфекции лимфоцитов не инфицированы ВИЧ. Механизм гибели неинфицированных CD4<sup>+</sup>лимфоцитов не ясен. Целью работы было выяснение роли аутоиммунной реакции в гибели CD4<sup>+</sup> лимфоцитов на модели иммунизации крыс gr120 гликопротеином ВИЧ-1. Обнаружено, что гибель CD4<sup>+</sup>лимфоцитов у крыс, иммунизированных gr120, является результатом совместного действия аутоантител к CD4 и ревматоидного фактора.

*Ключевые слова:* gr120, вирус иммунодефицита человека, ревматоидный фактор.

Известно, что развитие иммунодефицита при ВИЧ инфекции является результатом истощения CD4<sup>+</sup>лимфоцитов. Несмотря на то, что прямое цитопатическое влияние ВИЧ на CD4<sup>+</sup>клетки вносит вклад в их истощение, большинство из гибнущих при ВИЧ инфекции лимфоцитов не инфицированы ВИЧ. Почему гибнут неинфицированные CD4<sup>+</sup>лимфоциты сегодня не известно. Получено много фактов, демонстрирующих, что незараженные CD4<sup>+</sup>лимфоциты при ВИЧ-инфекции гибнут по механизму апоптоза, чувствительность лимфоцитов к апоптозу коррелирует с прогрессированием болезни. Рассматривают несколько причин апоптоза неинфицированных CD4<sup>+</sup>клеток при ВИЧ-инфекции. Наиболее обоснованной является гипотеза активационно-индуцированной смерти незараженных CD4<sup>+</sup>лимфоцитов. Согласно данной гипотезе незараженные CD4<sup>+</sup>лимфоциты подвергаются генерализованной активации и приобретают чувствительность к апоптозу. Впоследствии активированные клетки, встречаясь с индуктором апоптоза, подвергаются апоптозу. Однако фактор генерализованной активации незараженных CD4<sup>+</sup>лимфоцитов, а также индуктор апоптоза, т.е. фактор, убивающий активированные CD4<sup>+</sup>лимфоциты, остаются не известными.

Хроническую поликлональную активацию незараженных CD4<sup>+</sup>лимфоцитов при ВИЧ инфекции могут вызывать аутоантитела к CD4. Гипотеза, рассматривающая ведущую роль аутоиммунной реакции к CD4 в патогенезе СПИДа, впервые предложена Kennedy, в 1992 г. [5]. Keay и Соогэ показали наличие идиотип-антиидиотипических взаимодействий между антителами к gp120 и аутоантителами к CD4 у ВИЧ-инфицированных людей [3, 4], в результате чего стал ясен механизм образования аутоантител к CD4 при ВИЧ инфекции. Gp120, активируя анти-gp120 лимфоциты, запускает также активацию связанных с ними в идиотип-антиидиотипических взаимодействиях аутореактивных анти-CD4<sup>+</sup> лимфоцитов. Гипотеза получила многочисленные экспериментальные подтверждения [1], однако не стала общепринятой, так как не у всех ВИЧ-инфицированных удалось выявить в плазме крови антитела к CD4.

Чтобы выяснить роль аутоиммунной реакции к CD4 в гибели CD4<sup>+</sup>лимфоцитов мы проиммунизировали крыс Wistar реком-

бинантным gp120 гликопротеином ВИЧ однократно в дозе 20 мкг на животное внутривенно в составе неполного адьюванта Фрейнда (НАФ). Контрольные крысы получили инъекцию НАФ. У животных еженедельно забирали кровь. В плазме крови определяли антитела к gp120 ВИЧ и аутоантитела к рекомбинантному CD4 крыс (R&DSystems) методом иммуноферментного анализа. Также определяли титр ревматоидного фактора (РФ) методом непрямой агглютинации танизированных нагруженных гомологичным IgG эритроцитов. Количество CD4<sup>+</sup>лимфоцитов в периферической крови крыс измеряли методом проточной цитофлуориметрии, используя моноклональные антитела к CD4 меченые ФИТЦ.

Иммунизация крыс Wistar gp120 ВИЧ вызвала продукцию не только антител к gp120 ВИЧ, но и аутоантител к CD4. Снижение CD4<sup>+</sup> лимфоцитов у крыс, иммунизированных gp120 ВИЧ, носило транзиторный скачкообразный характер. Тем не менее, среднее за период наблюдения значение количества CD4<sup>+</sup>лимфоцитов у крыс, иммунизированных gp120 ВИЧ ( $1278 \pm 817$  клеток в мкл), достоверно ниже ( $p < 0,05$ ) среднего уровня CD4<sup>+</sup>лимфоцитов в периферической крови контрольных крыс ( $1778 \pm 742$  клеток в мкл). Вопреки ожиданиям непосредственной связи между уровнем аутоантител к CD4 и количеством CD4<sup>+</sup>лимфоцитов в крови не выявлено. В то же время мы заметили, что снижение количества CD4<sup>+</sup>лимфоцитов в крови крыс совпадает со спонтанным повышением уровня ревматоидного фактора в крови. РФ был исследован у крыс, иммунизированных gp120, с целью выяснения его роли в регуляции иммунного ответа к gp120, так как ранее на нескольких экспериментальных моделях было показано его участие в предотвращении развития аутоиммунных заболеваний [2]. Сравнительный анализ количества CD4<sup>+</sup>лимфоцитов у крыс с относительно высоким уровнем РФ (титр  $> 1:16$ ) ( $920 \pm 366$  клеток в мкл крови) и крыс с относительно низким уровнем РФ (титр  $\leq 1:16$ ) ( $1524 \pm 953$  клеток в мкл крови), выявил достоверно низкий уровень CD4<sup>+</sup> клеток у крыс с высоким уровнем РФ. Данная связь характерна только для крыс, иммунизированных gp120 и продуцирующих аутоантитела к CD4. У контрольных крыс количество CD4<sup>+</sup> клеток не зависит от содержания РФ в крови

(при титре РФ >1:16–1727±728 клеток, при титре РФ ≤1:16–1620±794 клеток). На основании полученных данных можно предполагать, что гибель CD4<sup>+</sup>лимфоцитов у крыс, иммунизированных gp120 – результат совместного действия аутоантител к CD4 и ревматоидного фактора.

Для проверки этого предположения был проведен эксперимент *in vitro*. Лимфоциты интактной крысы в течение 24 часов инкубировали с сывороткой, содержащей аутоантитела к CD4, полученной от крыс, иммунизированных gp120 ВИЧ. После завершения инкубации добавляли сыворотку, содержащую РФ. Через 3 часа подсчитывали количество живых и мертвых клеток в камере Горяева с использованием красителя трипанового синего. В результате обнаружили гибель 40% лимфоцитов, что достоверно ниже гибели лимфоцитов в случае добавления сыворотки, не содержащей РФ (количество погибших клеток составило 16,5%), или в случае инкубации с сывороткой, не содержащей антитела к CD4, где также добавляли РФ-содержащую сыворотку (количество погибших клеток – 5,3%).

Таким образом, иммунизация крыс Wistar gp120 гликопротеином ВИЧ вызывает развитие аутоиммунной реакции к CD4 и транзитное снижение CD4<sup>+</sup> лимфоцитов на фоне высокого уровня ревматоидного фактора в крови. В эксперименте *in vitro* сыворотка, содержащая ревматоидный фактор, вызывает гибель лимфоцитов крыс, предварительно инкубированных с сывороткой, содержащей аутоантитела к CD4. Данные факты свидетельствуют о том, что гибель CD4<sup>+</sup> лимфоцитов у крыс, иммунизированных gp120, является результатом совместного действия аутоантител к CD4 и ревматоидного фактора.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Heeney J, Jonker R, Koornstra W, et al. // J. Med. Primatol. 1993. Vol. 22. P. 194-200.
2. Beduleva L., Menshikov I., Stolyarova E. // Int. J. Rheum. Dis. 2014. P. 1–13.
3. Corre J.P., Fevrier M., Chamaret S., et al. // Eur. J. Immunol. 1991. Vol. 21. P. 743-751.
4. Keay S., Weckler W., Wasserman S. // J. Infect. Dis. 1995. Vol. 171. P. 312-319.
5. Kennedy J.R. // Med. Hypotheses. 1992. Vol. 37. P. 16-19.

### ROLE OF RHEUMATOID FACTOR IN THE DEATHS OF CD4<sup>+</sup> LYMPHOCYTES IN RATS IMMUNIZED WITH GP120 GLYCOPROTEIN OF HIV-1.

**Khramova T. V., Beduleva L. V., Berezkina S. Yu., Menshikov I. V.**

*Udmurt State University, Izhevsk, Russia*

It is known that the development of immunodeficiency in HIV infection is the result of depletion of CD4<sup>+</sup>lymphocytes. The direct cytopathic effect of HIV contributes to the depletion of CD4 T cells, but uninfected CD4<sup>+</sup>cells mostly die in the course of HIV infection. The mechanism of destruction of uninfected CD4<sup>+</sup>lymphocytes is not clear. The aim was to elucidate the role of autoimmunity in the death of CD4<sup>+</sup>lymphocytes in the rat model of immunization with gp120 glycoprotein of HIV-1. It was found that the death of CD4<sup>+</sup>lymphocytes from rats immunized with gp120 is the result of the combined action of antibodies to CD4 and rheumatoid factor.

*Keywords:* gp120, human immunodeficiency virus, rheumatoid factor.

**Раздел 7**  
**ИММУНОБИОТЕХНОЛОГИЯ**  
**И МЕДИЦИНСКАЯ ХИМИЯ**

## КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОТИВОВИРУСНЫХ И ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ НОВОЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ КОМПОЗИЦИИ НА ОСНОВЕ КРЕМНИЙСОДЕРЖАЩЕГО ГЛИЦЕРОГИДРОГЕЛЯ «СИЛАТИВИТ» С ТРИАЗАВИРИНОМ

Ваневская Е. А.<sup>1</sup>, Штанько И. Н.<sup>2</sup>, Мандра Ю. В.<sup>1</sup>, Хонина Т. Г.<sup>2</sup>,  
Базарный В. В.<sup>1</sup>, Чупахин О. Н.<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Уральский государственный медицинский университет Минздрава России; <sup>2</sup>Институт органического синтеза им. И. Я. Постовского УрО РАН; <sup>3</sup>Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б. Н. Ельцина, Екатеринбург, Россия

Цель исследования – повышение эффективности комплексного лечения больных простым герпесом губ путем обоснованного местного применения новой фармацевтической композиции. Основой новой фармацевтической композиции являлся кремнийсодержащий глицерогидрогель «Силативит». В качестве активной лекарственной добавки был использован триазавирин. Клинико-лабораторное исследование показало наличие противовирусных и иммуностропных свойств новой фармацевтической композиции.

**Ключевые слова:** триазавирин, кремнийсодержащий глицерогидрогель «Силативит», простой герпес губ.

Простой герпес губ относится к наиболее частым проявлениям герпетической инфекции [1,2]. Его обострение сопровождается выраженными нарушениями иммунитета. По этой причине оценка иммунного статуса является диагностическим критерием состояния пациентов, а иммунокоррекция – важным звеном комплексного лечения, которое позволяет подавить персистенцию вирусов и поддерживать длительную ремиссию [1, 3, 4]. По этой причине повышение эффективности местного лечения с использованием препаратов, сочетающих противовирусное и иммуномодулирующее действие, является залогом успеха комплексной терапии пациентов с простым герпесом губ [3, 4].

Несмотря на наличие широкого спектра средств местного лечения герпетической инфекции, все они обладают рядом недостатков, к которым относятся невысокая биодоступность, ограниченность применения фазой развития патологических элементов, неудобная схема использования, длительность на-

ступления лечебного действия, развитие резистентности вирусов, наличие побочных эффектов [3, 4]. Таким образом, поиск новых средств и методов местного лечения пациентов с простым герпесом губ остается актуальной общемедицинской проблемой.

**Цель исследования** – повышение эффективности комплексного лечения больных простым герпесом губ путем обоснованного местного применения новой фармакологической композиции.

**Методы исследования.** Нами предложен состав новой фармацевтической композиции [5], содержащей противовирусный препарат семейства азолоазиннов триазавирин (1%) и в качестве основы – кремнийсодержащий глицерогидрогель «Силативит»  $\text{Si}(\text{C}_3\text{H}_7\text{O}_3)_4 \cdot 6\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3 \cdot 24\text{H}_2\text{O}$ , проявляющий выраженное ранозаживляющее и эпителизирующее действие, а также высокую трансмукозную и противоотечную активность.

Для изучения клинической эффективности комплексного лечения больных простым герпе-



сом губ с использованием новой фармацевтической композиции проведено рандомизированное клинико-лабораторное открытое контролируемое исследование на базе Стоматологической поликлиники Уральского государственного медицинского университета (УГМУ). В исследование включено 147 пациентов с диагнозом «Простой герпес губ» (B00.11) по МКБ-10. Для клинического исследования эффективности применения новой фармакологической композиции в комплексном лечении пациентов с простым герпесом губ были сформированы 2 группы: исследуемая группа и группа сравнения, при этом всем пациентам было проведено комплексное клинико-лабораторное обследование. Методы обследования пациентов включали: клинические (опрос, осмотр, индексная оценка стоматологического статуса); социологические (оценка уровня боли с помощью визуально-аналоговой шкалы боли (ВАШ), оценка качества жизни (КЖ) с помощью специализированного валидированного опросника (OHIP-49 RU); рентгенологические и функциональные методы обследования (ОПТГ или КЛКТ, ЛДФ); лабораторные методы (исследование мазка эпителия слизистой оболочки рта методом реакции иммунофлуоресценции, исследование свойств ротовой жидкости (РЖ) (Отдел общей патологии Центральной научно-исследовательской лаборатории УГМУ), гематологический и биохимический анализ).

Всем пациентам было назначено идентичное комплексное лечение простого герпеса губ по общепринятой схеме в соответствии с Клиническими рекомендациями Российского общества дерматовенерологов [1]. Пациентам исследуемой группы и группы сравнения было назначено различное местное лечение: в исследуемой группе – аппликации новой фармацевтической композиции на основе глицерогидрогеля «Силативит» с триазавирином; в группе сравнения – традиционный местный противовирусный препарат – мазь ацикловир 5%.

Осмотр пациентов проводился на 3, 5, 7 и 14 сутки. Динамическое наблюдение осуществлялось также через 12 и 24 месяца.

**Основные результаты.** Результаты клинического наблюдения за больными показали, что средние сроки эпителизации патологических элементов в исследуемой группе составили ~5 суток; в группе сравнения ~7 суток. По данным ВАШ на 5 сутки комплексного

лечения снижение показателя уровня боли в исследуемой группе было в 1,5 раза больше (полное купирование болевого синдрома), чем в группе сравнения. Интегральный показатель КЖ в исследуемой группе был наиболее значимым на 5 сутки комплексного лечения (в 1,33 раза выше, чем в группе сравнения).

Динамика общих и иммунологических показателей РЖ, а также гематологических показателей свидетельствует о быстрой нормализации их в исследуемой группе. Среди общих показателей РЖ пациентов наиболее информативными для оценки эффективности проведенного комплексного лечения являлось изменение общего белка и количества лейкоцитов. После окончания периода наблюдения в исследуемой группе отмечалось снижение уровня общего белка РЖ на 42% против 31% в группе сравнения; количества лейкоцитов – в 4,68 раз в исследуемой группе против 3,85 раз в группе сравнения.

При оценке иммунологических показателей РЖ пациентов на 14 сутки комплексного лечения установлены наибольшие изменения в уровне лактоферрина (ЛФ). На 14 сутки комплексного лечения снижение уровня ЛФ в исследуемой группе составило  $8310,2 \pm 2068,5$  ( $p \leq 0,05$ ) против  $6934,7 \pm 1529,3$  нг/мл ( $p \leq 0,05$ ) в группе сравнения. Изменение содержания SIgA в РЖ пациентов исследуемой группы составило  $117,9 \pm 25,6$  ( $p \leq 0,05$ ) против  $114,4 \pm 30,0$  ( $p \leq 0,05$ ) мг/мл в группе сравнения.

Анализ общих и иммунологических показателей РЖ свидетельствует об улучшении динамики в исследуемой группе, которая, скорее всего, достигается за счет выраженного противовирусного и иммуномодулирующего действия новой фармацевтической композиции на основе глицерогидрогеля «Силативит» с триазавирином.

Вместе с этим анализ показателей РЖ пациентов с простым герпесом губ выявил отсутствие значительных изменений в содержании интерферона- $\alpha$  (ИФ- $\alpha$ ). Так, по окончании периода наблюдения изменение уровня ИФ- $\alpha$  в исследуемой группе составило  $2,50 \pm 0,02$  пг/мл,  $p \leq 0,05$ , в группе сравнения –  $1,80 \pm 0,02$  пг/мл,  $p \leq 0,05$ , что согласуется с литературными данными о выраженных иммуносупрессивных свойствах герпес-вирусов.

Таким образом, анализ данных клинических, лабораторных и социологических методов доказал наибольшую эффективность результатов

комплексного лечения пациентов с простым герпесом губ в исследуемой группе.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кубанова А. А. // Дерматовенерология: клинические рекомендации. Российское общество дерматовенерологов / М.: ДЭКС-Пресс, 2010. 428 с.
2. Widener R. W., Whitley R. J. // Handbook of Clinical Neurology. – 2014. – Vol. 123. – P. 251-263.
3. Stoopler E. T., Balasubramaniam R. // Journal of California Dental Association. – 2013. – Vol. 41. – P. 259-262.
4. Tubridy E., Kelsberg G., Anna St.L. // Journal of Family Practice. – 2014. – Vol. 63. – P. 104-105.
5. Ваневская А. Е. Клинико-экспериментальное обоснование повышения эффективности комплексного лечения пациентов с простым герпесом губ: автореф. ... канд. мед. наук – Екатеринбург, 2014.

## CLINICAL AND LABORATORY STUDY OF ANTIVIRAL AND IMMUNOLOGICAL PROPERTIES OF NEW PHARMACEUTICAL COMPOSITION BASED ON SILICONE-CONTAINING GLYCEROHYDROGEL "SILATIVIT" WITH TRIAZAVIRIN

Vanevskaya E. A.<sup>1</sup>, Shtan'ko I. N.<sup>2</sup>, Mandra J. V.<sup>1</sup>, Khonina T. G.<sup>2</sup>, Bazarnii V. V.<sup>1</sup>, Chupakhin O. N.<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Ural State Medical University; <sup>2</sup>Postovsky Institute of Organic Synthesis of Ural Branch of RAS;

<sup>3</sup>Ural Federal University, Ekaterinburg, Russia

The purpose of research was improving of the complex treatment of patients with Herpes simplex of lips by local application of the new pharmaceutical composition. The basis of the new pharmaceutical composition was the silicone-containing glycerohydrogel "Silativit". The Triazavirin was used as active drug additives. Clinical and laboratory studies showed antiviral and immunotropic properties of the new pharmaceutical composition.

*Keywords:* Triazavirin, silicone-containing glycerohydrogel "Silativit", Herpes simplex of lips.

## БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ПОЛУСИНТЕТИЧЕСКИХ ПРОИЗВОДНЫХ БЕТУЛИНА

Галайко Н. В., Толмачева И. А., Гришко В. В.

*Институт технической химии УрО РАН, Пермь, Россия*

Исследования связаны с разработкой методов трансформации C2 оксимированных циклических и 2,3-секопроизводных бетулина – перспективных структурных платформ для разработки новых химиотерапевтических агентов. Среди синтезированных N, O-содержащих линейных, циклических и гетероциклических тритерпеновых производных выявлены соединения с высоким уровнем противовирусного (ВИЧ-1, вирусы гриппа А и везикулярного стоматита) и цитотоксического действия.

*Ключевые слова:* бетулин, 2,3-секотритерпеноиды, противовирусная активность, цитотоксическая активность.

**Актуальность и цель работы.** Пентациклический тритерпеноид бетулин (бетулинол, луп-20(29)-ен-3 $\beta$ ,28-диол) является основным (до 40%) компонентом бересты березы разных видов и может быть легко выделен в неогра-

ниченных количествах из отходов деревообрабатывающего производства. Разнообразная биологическая активность бетулина (в т.ч. противоопухолевая, противовирусная, иммуномодулирующая, противовоспалительная,

бактерицидная, гепатопротекторная и т.д.) на фоне отсутствия каких-либо токсических эффектов обуславливает постоянный интерес исследователей к данному соединению, как к одному из наиболее перспективных источников новых фармакологически активных агентов. Многочисленные исследования, посвященные химическим превращениям бетулина и его производных, как правило, связаны с функционализацией тритерпеновой молекулы. Значительно реже публикуются работы о перестроении углеродного остова тритерпеноидов, например, сужении, расширении или фрагментации кольца А. При этом практически не рассматриваются вопросы дальнейшей модификации полученных продуктов.

**Материалы и методы.** Наши исследования связаны с разработкой методов синтеза и трансформацией А-секотритерпеновых производных бетулина и оценкой перспективности продуктов синтеза в качестве химиотерапевтических агентов.

Известные полусинтетические производные бетулина – метиловый эфир бетулоновой кислоты и аллобетулон – активно используются при получении широкого спектра N, O-содержащих тритерпеноидов с циклической, гетероциклической или фрагментированной структурой.

В процессе синтеза новых биологически активных соединений в качестве ключевых нами использованы два типа интермедиатов: C2 оксимированные циклические тритерпеноиды и 2,3-секоальдегидонитрилы лупанового и 18 $\alpha$ H-олеананового типов, полученные из метилового эфира бетулоновой кислоты и аллобетуллона соответственно [1]. Основное внимание при этом уделено превращениям биологически активных 1-циано-2,3-секотритерпеноидов, наличие в структуре которых реакционно-активных нитрильной и альдегидной групп открывает новые возможности для разноплановой химической модификации и, как следствие, повышает вероятность образования перспективных для медицинских целей соединений.

**Результаты.** Учитывая основные тенденции современных исследований в области направленного синтеза тритерпеновых производных с противовирусной и противоопухолевой (цитотоксической) активностью, нами получен широкий спектр N, O-содержащих линейных (функционализированные гидразоны, ги-

дразиды, альдоксимы, динитрилы, енамины, продукты цианэтилирования, амидоксимы), циклических (еннитрилы и енаминитрилы) и гетероциклических (замещенные 1,3,4-оксадиазолины, 5-метилизоксазолы, 2-метилоксазолы, 1,2,3-триазолы) производных. В результате биологических исследований среди продуктов синтеза отобраны соединения с цитотоксической, иммуотропной и противовирусной активностью.

Так, при тестировании противовирусного действия *in vitro* оксимированных предшественников, 2,3-секопроизводных и А-пентациклических продуктов синтеза в отношении оболочечных вирусов гриппа А и ВИЧ-1 в качестве наиболее перспективных соединений отобраны лупановые производные – кетоксим и 2,3-секоальдоксим, сочетающие противовирусную активность в отношении ВИЧ-1 и вируса гриппа А ( $EC_{50}$  0.06 мкМ и 12.9–18.2 соответственно) [2].

Испытание ингибирующих свойств функционализированных 2,3-секогидразонов в отношении оболочечного вируса везикулярного стоматита (ВВС) *in vitro* позволило выявить анти-ВВС активные ацетилгидразоны лупанового и 18 $\alpha$ H-олеананового типов [3]. Для 18 $\alpha$ H-олеананового ацетилгидразона, продемонстрировавшего также наиболее высокое ( $EC_{50}$  0.3 нМ) профилактическое и вирулицидное анти-ВВС действие, противовирусные свойства подтверждены на модели куриных эмбрионов. При этом данное соединение нетоксично и проявляет *in vitro* / *in vivo* иммунорегуляторные эффекты [4].

Анализ взаимосвязи структура-активность 18 $\beta$ H-олеананового аналога, а также продуктов функционализации и гетероциклизации лупанового и 18 $\alpha$ H-олеананового ацетилгидразонов не выявил анти-ВВС значимых соединений, что свидетельствует о ключевой роли 18 $\alpha$ H-олеананового скелета, амидного протона и фармакофорного заместителя в проявлении анти-ВВС свойств ацетилгидразоном.

Несмотря на проявленную высокую ( $EC_{50}$  0.3-0.6 мкМ) анти-ВВС активность, лупановые 1,3,4-оксадиазолины оказались довольно токсичными и имели низкий индекс селективности (ТИ 3-5). Более детальное исследование цитотоксических свойств оксадиазолинов в отношении клеток рака легкого А-549, меланомы MS и рабдомиосаркомы RD подтвердило их токсический эффект и выявило в каче-

стве наиболее активного ( $IC_{50}$  5.8–18.6 мкМ) соединения 2,3-секолупановый (*R*)-изомер, для которого с помощью метода проточной цитометрии подтвержден проапоптозный механизм цитотоксического действия [5].

Расширенный скрининг цитотоксической активности продуктов синтеза показал, что большая часть соединений, включая продукты цианэтилирования, оксимирования, фрагментации и внутримолекулярной циклизации, оказывает слабый или умеренный эффект ( $\geq IC_{50}$  40 мкМ) в отношении тестируемых опухолевых клеток. В то же время полученные на основе C2 оксимированных интермедиатов конденсированные тритерпеновые азолы, как и описанный выше замещенный 2,3-секолупановый оксадиазолин, продемонстрировали выраженную токсичность в отношении клеток меланомы. Наиболее высокий уровень цитотоксической активности в отношении испытанных линий опухолевых клеток зарегистрирован для лупанового 1,2,3-триазола ( $IC_{50}$  5.6–16.8 мкМ).

Таким образом, нами экспериментально обоснована высокая перспективность 2,3-секотритерпеноидов и C2 оксимированных циклических тритерпеноидов, синтезированных

на основе доступного пентациклического тритерпеноида бетулина, в качестве структурных платформ для разработки новых противоопухолевых и противовирусных агентов. Среди продуктов синтеза выявлены соединения, высоко активные в отношении ВИЧ-1, вирусов гриппа А и везикулярного стоматита. Синтезированы гетероциклические тритерпеновые производные с высоким уровнем цитотоксического действия.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 13-03-00629.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tolmacheva I. A., Nazarov A. V., Maiorova O. A., Grishko V. V. *Chem Nat Comp* 2008, 5, 606–611.
2. Grishko V. V., Galaiko N. V., Tolmacheva I. A., Kucherov I. I., Eremin V. F. et al. *Eur J Med Chem* 2014, 83, 601–608.
3. Галайко Н. В., Толмачева И. А., Гришко В. В., Волкова Л. В., Перевозчикова Е. Н., Пестерева С. А. *Биоорг химия* 2010, 36, 556–562.
4. Gein S. V., Grishko V. V., Baeva T. A., Tolmacheva I. A. *Int J Pharm* 2013, 9, P. 74–79.
5. Grishko V. V., Tolmacheva I. A., Galaiko N. V., Pervoslavceva A. V., Anikina L. V. et al. *Eur J Med Chem* 2013, 68, 203–211.

## BIOLOGICAL ACTIVITY OF SEMISYNTHETIC BETULIN DERIVATIVES

Galaiko N. V., Tolmacheva I. A., Grishko V. V.

*Institute of Technical Chemistry of Ural Branch of the RAS, Perm, Russia*

The research relates to the development of methods for transformation of C2-oximized cyclic derivatives and 2,3-secoderivatives of betulin as of promising structural platforms to develop new chemotherapeutic agents. Among the synthesized *N, O*-containing linear, cyclic, and heterocyclic compounds triterpene derivatives, compounds featured by high level of antiviral (HIV-1, influenza A virus and vesicular stomatitis virus) and by cytotoxic action were identified.

## НОВЫЕ ГУАНИДИН-СОДЕРЖАЩИЕ НАНОКОМПОЗИТЫ СЕРЕБРА: ВЛИЯНИЕ НА БИОПЛЕНКИ *S. EPIDERMIDIS 33*

Горбунова М. Н.<sup>1</sup>, Лемкина Л. М.<sup>2</sup>, Кисельков Д. М.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБУН Институт технической химии УрО РАН; <sup>2</sup>ФГБУН Институт экологии  
и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь, Россия

Разработаны новые водорастворимые наноконпозиты на основе серебра и сополимеров 2,2-диаллил-1,1,3,3-тетраэтилгуанидиний хлорида с винилацетатом. В статье представлены результаты исследования антибактериального действия новых наноконпозитов на биопленки *S. epidermidis 33*. Наноконпозиты сильно ингибируют формирование биопленок *S. epidermidis 33*. Использование новых наноконпозитов приводит к значительному сокращению жизнеспособности клеток *S. epidermidis 33* в биопленках.

**Ключевые слова:** гуанидин, сополимеры, наноконпозиты, биоциды, биопленки.

В настоящее время в связи с распространенностью инфекционных заболеваний и резистентностью микроорганизмов к антибиотикам поиск соединений, обладающих противомикробным действием, является актуальным. Известно, что присутствие в элементарном звене полимеров гуанидиновой группы придает им высокую биоцидную активность [1], что позволяет широко использовать такие полимеры в качестве антибактериальных препаратов [2, 3]. Обычно мы изучаем бактерии, культивируя их в разбавленных средах. Однако природные популяции бактерий существуют в основном в виде закрепленных на субстратах биопленок. Микроорганизмы образуют биопленки на любых биотических и абиотических поверхностях, что создает большие проблемы в медицинской практике и в различных областях хозяйственной деятельности. Поэтому изучение действия антимикробных соединений на бактериальные биопленки является актуальным.

В настоящей работе приведены результаты исследования влияния сополимеров 2,2-диаллил-1,1,3,3-тетраэтилгуанидиний хлорида (АГХ) с винилацетатом и их наноконпозитов на формирование биопленок *S. epidermidis 33* и на уже разработанные в течение 24 ч биопленки. 2,2-Диаллил-1,1,3,3-тетраэтилгуанидиний хлорид (АГХ) получали по методике [4]. Винилацетат (ВА) фирмы "Lancaster" Винилацетат фирмы "Lancaster" перегоняли в вакуу-

ме, использовали фракцию с температурой кипения 72°C,  $n_{D}^{20} = 1.3951$ .

Сополимеризацию АГХ с ВА проводили в массе и растворе органических растворителей в присутствии ДАК. Сополимеры очищали двукратным переосаждением из раствора в метаноле в диэтиловый эфир и сушили в вакууме при 40-50°C до постоянной массы. Состав сополимеров рассчитывали по результатам элементного анализа.

Синтез наноконпозитов серебра и сополимера АГХ с ВА получали по методике [5]. Композит выделяли осаждением или диализом и сушили в вакуумном шкафу.

Спектры ЯМР <sup>13</sup>C регистрировали на спектрометре "Varian Mercury". Спектры поглощения регистрировали на спектрофотометре СФ 2000. Содержание Ag в водных растворах определяли на атомно-абсорбционном спектрометре iCE 3500 («Thermo Fisher Scientific», США). Микрофотографии получали на атомно-силовом микроскопе Solver PRO-M.

Определение противомикробной активности проводили методом двукратных серийных разведений на музейных тест-культурах. Учет результатов проводили по наличию и характеру роста культур на питательной среде.

Опыты по изучению влияния сополимеров и наноконпозитов на формирование биопленки *S. epidermidis 33* проведены в полистироловых 96-луночных планшетах для иммуноферментного анализа. В лунки вносили по 50 μl

каждого разведения сополимера (или нанокompозита) и 50  $\mu\text{l}$  клеточной суспензии *S. epidermidis* 33. В контрольные лунки вносили 50  $\mu\text{l}$  LB. Планшеты инкубировали в термостате при 37° в течение 24 часов. По окончании культивирования из лунок удаляли планктонную культуру и трижды промывали их 200  $\mu\text{l}$  10 mM фосфатного буфера (pH=7,2). Планшеты подсушивали в термостате, после чего в каждую лунку вносили по 50  $\mu\text{l}$  0,1% водного раствора генцианвиолета и окрашивали в течение 20 минут. Затем краситель удаляли, лунки однократно промывали 200  $\mu\text{l}$  фосфатного буфера и высушивали. Экстракцию связанного генцианвиолета проводили 96% этанолом путем измерения оптической плотности при 570 нм на микропланшетном ридере Benchmark Plus (Bio Rad Laboratories, USA).

Для изучения влияния сополимеров и нанокompозитов на уже образованные биопленки *S. epidermidis* 33, последние выращивали в планшетах для иммуноферментного анализа в течение 24 часов, после чего биопленки трижды промывали 10 mM фосфатным буфером (pH=7,2), и далее в каждую лунку вносили по 100  $\mu\text{l}$  раствора сополимера или нанокompозита в LB. Планшеты инкубировали в термостате при 37° в течение суток. Затем жидкость из лунок убирала, биопленки промывали фосфатным буфером, подсушивали и окрашивали генцианвиолетом в течение 20 минут, после чего краситель удаляли, содержимое лунок промывали и высушивали. Экстракцию связанного генцианвиолета проводили 96% этанолом путем измерения оптической плотности при 570 нм на микропланшетном ридере. В контрольные лунки вносили равные объемы LB.

Синтез нанокompозитов серебра с сополимером АГХ-ВА проводили восстановлением нитрата серебра боргидридом натрия в водном растворе сополимера. Реакция протекает с образованием устойчивых коричневых золь, из которых были выделены нанокompозиты, растворимые в спирте и воде.

Проведенные ранее токсикологические испытания показали, что все указанные сополимеры и нанокompозиты нетоксичны (ЛД<sub>50</sub> при введении в желудок  $\gg$  1000 мг/кг) и могут использоваться в медицинских целях. Результаты исследований противомикробной активности показали, что нанокompозиты обладают антибактериальной активностью как в отноше-

нии грам-положительных, так и грам-негативных микроорганизмов. Установлено, что гибель *Staphylococcus epidermidis* 33 отмечена при воздействии концентрации 7,8 мкг/мл нанокompозита. Нанокompозиты подавляют рост стафилококка и микрококка в интервале концентраций 31,2 мкг/мл. Гибель грамположительной спорообразующей бактерии *Bacillus subtilis* отмечена при воздействии концентрации 15,6 мкг/мл нанокompозита. Нанокompозиты в концентрации 62,5 мкг/мл также вызывают гибель *Escherichia coli*, в концентрации 31,2 мкг/мл – *Klebsiella pneumoniae*, в концентрации 62,5 мкг/мл – *Pseudomonas fluorescens*. Причем бактерицидная активность нанокompозитов выше по сравнению с сополимером. Такая универсальность противомикробного действия нанокompозитов на основе сополимеров 2,2-диаллил-1,1,3,3-тетраэтилгуанидиний хлорида с винилацетатом делает их перспективными для разработки новых водорастворимых антисептиков, в производстве лекарственных препаратов и биотехнологии.

Результаты исследования влияния сополимеров и нанокompозитов на образование биопленки *S. epidermidis* 33 показали, что сополимер АГХ-ВА не оказывает влияния на процесс формирования биопленки, более того введение сополимера в концентрациях до 300 мкг/мл способствует формированию пленок *S. epidermidis* 33. Использование нанокompозита в концентрации 15,6 мкг/мл приводит к значительному снижению биомассы биопленки, а при использовании нанокompозита в концентрации более 250 мкг/мл возможно практически полностью предотвратить образование биопленки.

Изучение влияния сополимеров АГХ-ВА и их нанокompозитов на уже образованные (в течение 24 ч) биопленки *S. epidermidis* 33 показало, что обработка биопленок сополимером в концентрации 62,5 мкг/мл и нанокompозитом в концентрации 15,6 мкг/мл приводит к снижению биомассы биопленки вдвое. Ведение сополимера и нанокompозита в концентрации 250 мкг/мл позволяет почти полностью разрушить уже сформированную (в течение 24 ч) биопленку.

Таким образом, были получены новые водорастворимые устойчивые нанокompозиты серебра и сополимеров 2,2-диаллил-1,1,3,3-тетраэтилгуанидиний хлорида с винилацетатом. Установлено, что полученные нанокompозиты

позиты обладают высокой бактерицидной активностью, обладающие способностью препятствовать формированию биопленки *S. epidermidis* 33 и разрушать уже сформированную биопленку *S. epidermidis* 33.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кнунянц И. Л. (ред.) Химическая энциклопедия. М.: Советская энциклопедия, 1988. Т. 1.
2. Gorbunova M. N. Guanidine-containing polymers. In: Encyclopedia of Biomedical Polymers and Polymeric Biomaterials. NY: Taylor&Francis Group, 2014.
3. Топчиев Д. А., Малкандуев Ю. А. Катионные полиэлектролиты: получение, свойства и применение. М.: Академкнига, 2004.
4. Воробьева А. И., Сагитова Д. Р., Горбунова М. Н. и др. // Высокомолекуляр. соединения. 2007. Т. 49Б. № 7. С. 1293-1298.
5. Gorbunova M. N., Lemkina L. M. // J. Nanopart. Research. 2014. V. 16. № 8. P. 2566.

### NEW GUANIDINE-CONTAINING SILVER NANOCOMPOSITES: INFLUENCE ON *S. EPIDERMIDIS* 33 BIOFILMS

Gorbunova M. N.<sup>1</sup>, Lemkina L. M.<sup>2</sup>, Kisel'kov D. M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Technical Chemistry of Ural Branch of Russian Academy of Sciences;

<sup>2</sup>Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms of Ural Branch of Russian Academy of Sciences, Perm, Russia

New water-soluble nanocomposites based on Ag and copolymers of 2,2-diallyl-1,1,3,3-tetraethylguanidiniumchloride with vinylacetate have been developed. Antibacterial action of new silver nanocomposites on *S. epidermidis* 33 biofilms is reported in this study. Nanocomposites strongly inhibited biofilms formation of *S. epidermidis* 33. The viability of *S. epidermidis* 33 cells in biofilms was considerably reduced by new nanocomposites.

### КОРРЕКЦИЯ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ ПРИ АЛЛОКСАНОВОМ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ ПРОИЗВОДНЫМИ 1,3,4-ТИАДИАЗИНА

Емельянов В. В.<sup>1</sup>, Саватеева Е. А.<sup>1</sup>, Сидорова Л. П.<sup>1</sup>, Цейтлер Т. А.<sup>1</sup>, Булавинцева Т. С.<sup>2</sup>, Гетте И. Ф.<sup>2</sup>, Данилова И. Г.<sup>2</sup>, Максимова Н. Е.<sup>1</sup>, Мочульская Н. Н.<sup>1</sup>, Чупахин О. Н.<sup>1</sup>, Черешнев В. А.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ФГАОУ ВПО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б. Н. Ельцина»; <sup>2</sup>Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, Екатеринбург, Россия

В проведенном исследовании впервые показана способность синтетических серосодержащих гетероциклических соединений ряда 1,3,4-тиадиазина частично корректировать метаболические нарушения при развитии аллоксанового СД у крыс. Соединения снижают выраженность гипергликемии у крыс, накопление гликозилированных белков в их крови и в органах, а также оказывают антиоксидантное действие.

**Ключевые слова:** сахарный диабет, 1,3,4-тиадиазины, оксидативный стресс, неферментативное гликозилирование белков.

Ведущую роль в формировании диабетического поражения сосудов и нервов играет вызванная длительной гипергликемией ак-

тивация неферментативного гликозилирования белков (НГБ) и оксидативный стресс [1]. Однако в клинической практике недостаточ-

но средств, корригирующих эти два патогенетических механизма. В разработке новых лекарственных средств для лечения сахарного диабета (СД) широко применяется моделирование данной патологии в эксперименте на животных. Ранее нами была выявлена способность гетероциклических соединений ряда 1,3,4-тиадиазина ингибировать реакцию НГБ и проявлять антиоксидантную активность в модельной системе [2]. Целью настоящей работы стала оценка способности производных 1,3,4-тиадиазина корригировать метаболические нарушения при экспериментальном СД.

Эксперимент был проведен на 45 белых беспородных крысах-самцах массой 200–250 г. Животные содержались в условиях лабораторного вивария, где поддерживалась постоянная температура в пределах 22–25°C и естественная смена дня и ночи, имели свободный доступ к пище и воде. Все манипуляции с животными осуществлялись с соблюдением этических принципов и в соответствии с Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и Совета от 22 сентября 2010 года по охране животных, используемых в научных целях.

Аллоксановый СД моделировали путем трехкратного внутрибрюшинного введения аллоксана в суммарной дозе 300 мг/кг массы животного [3]. Одновременно с индукцией СД начинали введение одного из представителей класса 5-арил-1,3,4-тиадиазин-2-аминов – соединений L-14, L-17, L-31, L-91, H-32, гидробромидов, в дозе 40 мг/кг массы животного (внутримышечно) с периодичностью 3 раза в неделю в течение 4-х недель. Вещества предварительно растворяли в инъекционной воде. По окончании эксперимента в плазме крови животных определяли концентрации глюкозы и общего белка. Для характеристики активности НГБ, у животных определяли концентрацию фруктозамина (ФА) плазмы и гликозилированного гемоглобина (HbA<sub>1c</sub>) крови, а также концентрацию ФА в приготовленных гомогенатах почки и печени. Состояние оксидативного стресса оценивали по концентрации малонового диальдегида (МДА) плазмы и активности каталазы цельной крови. Статистическая обработка результатов эксперимента проводилась с применением программного комплекса Biostatistica и MS Excel. Для сравнения двух независимых групп по количественному признаку использован непараметрический критерий Манна-Уитни. Различия между

показателями считались статистически значимыми, если уровень значимости  $p$  не превышал 0,05.

Введение аллоксана приводило к выраженной гипергликемии, накоплению гликозилированных белков в крови и органах животных. Так, концентрация глюкозы в крови крыс составила  $34,6 \pm 3,4$  ммоль/л, что в 6-7 раз превышает норму, а HbA<sub>1c</sub>  $9,1 \pm 0,8\%$ , что превышает норму в 1,5 раза. Гипергликемия служила триггером оксидативного стресса, накопления МДА и снижения активности каталазы крови.

Исследованные синтетические серосодержащие гетероциклические соединения обладали способностью частично корригировать метаболические нарушения при развитии аллоксанового СД. Ключевым моментом корригирующего действия производных 1,3,4-тиадиазина был антигипергликемический эффект. Выраженность этого эффекта для производных 1,3,4-тиадиазина в эксперименте убывала в ряду L-31 > L-91 > L-17 > H-32 > L-14, концентрация глюкозы крови при введении данных соединений составила  $10,3 \pm 0,9$ ,  $13,7 \pm 1,9$ ,  $23,7 \pm 2,2$ ,  $25,2 \pm 5,2$ ,  $29,3 \pm 3,0$  ммоль/л, соответственно ( $p < 0,05$ ). Концентрация HbA<sub>1c</sub> также статистически значимо снижалась и составила от  $5,3 \pm 0,3$  до  $7,5 \pm 0,7\%$  ( $p < 0,05$ ).

Показательно, что соединения L-31 и L-91, наиболее активно снижавшие гипергликемию, также увеличивали активность каталазы (до  $1025 \pm 87$  и  $1222 \pm 70$ , соответственно, против  $156 \pm 11$  мккатал/г гемоглобина в контроле), в то время как другие производные 1,3,4-тиадиазина этой способностью не обладали. Это может быть результатом предотвращения инактивации каталазы в результате неферментативного гликозилирования при коррекции гипергликемии данными соединениями [1, 4]. Статистически значимое снижение концентрации МДА плазмы было достигнуто при применении соединений L-91 ( $303 \pm 43$  мкмоль/л) и L-17 ( $106 \pm 27$  мкмоль/л) по сравнению с  $441 \pm 19$  мкмоль/л в контроле ( $p < 0,05$ ).

Производные 1,3,4-тиадиазина L-17, L-91, H-32, L-14 вызывали снижение концентрации ФА в гомогенатах почки (от  $15,6 \pm 2,2$  до  $23,9 \pm 2,0$  против  $45,2 \pm 3,8$  мкмоль/г белка в контроле,  $p < 0,05$ ) и печени (от  $5,1 \pm 0,9$  до  $9,5 \pm 2,5$  против  $20,9 \pm 8,0$  мкмоль/г белка в контроле,  $p < 0,05$ ). Соединение L-31 отличалось от дру-



гих 1,3,4-тиадиазинов тем, что не снижало накопления ФА в почках.

Выявленную способность исследованных соединений ослаблять метаболические нарушения при аллоксановом СД мы связываем со способностью 1,3,4-тиадиазинов трансформироваться в тиольные производные [5]. Тиолы, в свою очередь, могут выступать в роли блокаторов НГБ и антиоксидантов в крови и органах животных, а также защищать  $\beta$ -клетки островков Лангерганса от гибели в условиях индуцированного аллоксаном оксидативного стресса [1, 3]. Таким образом, в проведенном исследовании впервые показана способность синтетических серосодержащих гетероциклических соединений ряда 1,3,4-тиадиазина корригировать метаболические нарушения при развитии аллоксанового СД у крыс.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Емельянов В. В., Максимова Н. Е., Мочульская Н. Н., Черешнев В. А. // *Вопр. биол., мед. и фарм. химии.* – 2010. – № 1. – С. 3–15.
2. Емельянов В. В., Саватеева Е. А., Мусальникова А. В. и др. // *Материалы Всероссийской научно-практической конференции биохимиков и специалистов по лабораторной медицине «Медицинская биохимия и клиническая лабораторная диагностика в аспекте модернизации системы научных исследований».* Омск: Издательство ОмГМА, 2011. – С. 89–92.
3. Медведева С. Ю., Булавинцева Т. С., Данилова И. Г. и др. // *Вестник Уральской мед. акад. науки.* – 2012. – № 3. – С. 30–33.
4. Bakala H., Hamelin M., Mary J. et al. // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2012. – V. 1822. – P. 1527–1534.
5. Перова Н. М., Егорова Л. Г., Сидорова Л. П. и др. // *Журнал орг. химии.* – 1994. – Т. 30, Вып. 10. – С. 1560–1565.

## CORRECTION OF METHABOLIC DISORDERS IN ALLOXAN DIABETES MELLITUS WITH 1,3,4-THIADIAZINE DERIVATIVES

Emelyanov V. V.<sup>1</sup>, Savateeva E. A.<sup>1</sup>, Sidorova L. P.<sup>1</sup>, Tseitler T. A.<sup>1</sup>,  
Bulavintseva T. S.<sup>2</sup>, Gette I. F.<sup>2</sup>, Danilova I. G.<sup>2</sup>, Maksimova N. E.<sup>1</sup>,  
Mochulskaya N. N.<sup>1</sup>, Chupakhin O. N.<sup>1</sup>, Chereshnev V. A.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Professional Education «Ural Federal University named after the first President of Russia B. N. Yeltsin»; <sup>2</sup>Institute of immunology and physiology of UB RAS, Ekaterinburg, Russia

The conducted study demonstrates for the first time the ability of synthetic sulfur-containing heterocyclic compounds of 1,3,4-thiadiazine class to partly correct metabolic disorders during development of alloxan diabetes mellitus in rats. The compounds reduce the severity of hyperglycemia, accumulation of glycosylated proteins in blood and organs, and have an antioxidant effect.

*Key words:* diabetes mellitus, 1,3,4-thiadiazines, oxidative stress, nonenzymatic protein glycation.

## ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО ГИБРИДНОГО БЕЛКА OPRF-ATOX *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* И ИССЛЕДОВАНИЕ ЕГО ПРОТЕКТИВНЫХ СВОЙСТВ

Калошин А. А., Солдатенкова А. В., Леонова Е. И.,  
Михайлова Н. А.

ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова, Москва, Россия

Получен рекомбинантный гибридный (слитый) белок OprF-aTox, который содержал последовательности белка F наружной мембраны (OprF) и дефектной формы экзотоксина A *Pseudomonas aeruginosa*. Выявлено, что полученный белок OprF-aTox защищал мышей от экспериментальной инфекции, вызываемой введением штамма PA-103 *P. aeruginosa*. При двукратной иммунизации гибридный белок оказался более эффективным по сравнению с рекомбинантными белками OprF и анатоксином вводимыми по отдельности и в виде комплекса. Это открывает перспективу использования гибридного белка OprF-aTox для создания антисинегнойной вакцины.

**Ключевые слова:** *Pseudomonas aeruginosa*, белок F наружной мембраны (OprF), экзотоксин A, анатоксин, рекомбинантный белок, иммунизация.

Условно патогенный микроорганизм *Pseudomonas aeruginosa* является одним из распространенных возбудителей нозокомиальных инфекций. Особенность данного патогена заключается в том, что практически все его штаммы высоко резистентны к большинству применяемых в клинике антибиотиков и химиотерапевтических средств [3], что обуславливает актуальность исследований по разработке препаратов для иммунопрофилактики и иммунотерапии заболеваний, вызываемых синегнойной палочкой.

Полученная ранее рекомбинантная форма высокоиммуногенного порообразующего белка F наружной мембраны (OprF) защищала мышей от заражения нетоксигенным штаммом *P. aeruginosa* [1]. Так же, был получен и исследован рекомбинантный анатоксин (нетоксичный вариант экзотоксина A без 106 C-концевых аминокислотных остатков), способный защищать мышей от экзотоксина A – одного из основных факторов поражения *P. aeruginosa* [2].

Цель настоящих исследований заключалась в разработке препарата способного вызывать иммунные реакции против поверхностных антигенов клетки возбудителя и способствовать нейтрализации экзотоксина A. Для достижения поставленной цели решено использовать

простую комбинацию отдельных белков либо получить гибридный (слитый) белок.

**Материалы и методы.** С целью получения конструкций для экспрессии генов слитых белков использована плаزمиды (pET28-aTox), предназначенная для синтеза рекомбинантного анатоксина [2], в которую встроили последовательность гена *oprF*. Ген *oprF* был амплифицирован с помощью ПЦР. Матрицей являлась плазмидная конструкция для синтеза рекомбинантного белка OprF (pQE30-oprF) [1]. ПЦР проводили в двух вариантах. При амплификации первого варианта праймеры имели на 5'-концах дополнительный сайт рестрикции Xho I, а при втором – использовали праймеры с сайтами рестрикции Hind III. В первом варианте, амплификат встроили в плазмиду pET28-aTox по сайту Xho I, а во втором – по сайту рестрикции Hind III. Для трансформации использовали клетки *E. coli* штамма BL21 (DE3). Секвенирование проводили в приборе ABI Prism 3100 Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Синтез рекомбинантных белков индуцировали с помощью ИПТГ. Очистку рекомбинантных продуктов осуществляли методом аффинной хроматографии с использованием Ni-сефарозы (Amersham) в 8 М буферном растворе мочевины. Препараты рекомбинантных

белков растворяли в физиологическом растворе в результате диализа. Определение концентрации белков проводили в спектрофотометре Genesys 6 (Thermoscientific) при длине волны 280 нм. При анализе белковых продуктов использовали прибор для капиллярного электрофореза QIAxel Advanced (QIAGEN). В иммуноблоттинге использовали сыворотки крови кроликов, иммунизированных рекомбинантным белком OprF [1] и рекомбинантным анатоксином [2].

Для иммунизации рекомбинантные белки сорбировали на гидроксиде алюминия. Препараты вводили внутривентриально в объеме 0,5 мл мышам массой 16-18 г. При индукции экспериментальной инфекции животных заражали внутривентриально в объеме 0,5 мл живой вирулентной культурой *P. aeruginosa* штамма PA-103, после чего в течение семи дней, проводили учет погибших и выживших животных.

**Основные результаты.** В качестве основы для создания конструкций для синтеза гибридных белков была использована плаزمиды рЕТ28-аТох, несущая ген анатоксина который был встроены по сайтам рестрикции Hind III и Xho I [2]. В одном варианте, ген *oprF* встраивался со стороны 3'-конца гена анатоксина, то есть по сайту рестрикции Xho I. Во втором варианте ген *oprF* встраивался со стороны 5'-конца гена анатоксина, то есть по сайту рестрикции Hind III. В результате получены гены, кодирующие два гибридных варианта: аТох-OprF и OprF-аТох.

При экспрессии конструкции рЕТ28-oprF-аТох (второй вариант) в клетках *E. coli* наблюдался синтез рекомбинантного продукта с молекулярной массой около 100 кДа, что совпадало с расчетной (105 кДа). В случае первого варианта синтез рекомбинантного продукта был незначителен. Очищенный рекомбинантный белок OprF-аТох в иммуноблоттинге специфично реагировал с сыворотками иммунными к рекомбинантным OprF и анатоксину.

Гибридный белок OprF-аТох, а также комплекс белков OprF и анатоксина были изучены по способности защищать мышей от инфекции высокотоксигенным штаммом *P. aeruginosa*.

Исследование проводилось в сравнении с отдельным введением OprF и анатоксина. Ранее были установлены оптимальные дозы введения на одну мышь для OprF – 25 мкг [1] и для анатоксина – 50 мкг [2]. При подготовке комплексного препарата смешивали белки OprF и анатоксин в соотношении 1:2, то есть в препарате для одной иммунизации присутствовало 25 мкг OprF и 50 мкг анатоксина. При введении гибридного белка OprF-аТох использовали дозы 25, 50 и 100 мкг. Контрольная группа включала животных той же партии, которым вводили физиологический раствор. Через две недели после курса иммунизаций мышам вводили 12,5; 50 и 200 млн. микробных клеток (млн. м.к.) *P. aeruginosa*. Животным контрольной группы вводили 6,25; 25 и 100 млн. м.к. ЛД<sub>50</sub> для контрольной группы мышей соответствовала 33 млн. м.к.; для животных иммунизированных OprF – 61,6 млн. м.к., анатоксином – 72,4 млн. м.к. Соответственно индексы эффективности протективных свойств (отношение ЛД<sub>50</sub> для иммунизированных мышей к ЛД<sub>50</sub> в контрольной группе) OprF и анатоксина составили 1,9 и 2,2. При иммунизации комплексным препаратом выявлено увеличение защитных свойств. ЛД<sub>50</sub> для данной группы животных составила 114,9 млн. м.к., а индекс эффективности соответствовал 3,5. Для гибридного белка OprF-аТох установлены следующие значения ЛД<sub>50</sub>: 62,7 млн. м.к. – для иммунизирующей дозы 25 мкг; 155,1 млн. м.к. – для дозы 50 мкг и 102,3 млн. м.к. – для дозы 100 мкг. Индекс эффективности оптимальной дозы (50 мкг) составил 4,7.

Полученные данные позволяют рассматривать гибридный рекомбинантный белок OprF-аТох в качестве компонента вакцины, предназначенной для профилактики синегнойной инфекции.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Калошин А. А., Гатыпова Е. В., Михайлова Н. А. Биотехнология. 2011. № 2. С.74-84.
2. Калошин А. А., Исаков М. А., Михайлова Н. А., Вертиев Ю. В. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2012. Т. 154. № 9. С. 330-335.
3. Strateva T. and Yordanov D. Journal of Medical Microbiology. 2009. Vol.58. P.1133-1148.

## OBTAINING THE RECOMBINANT FUSION PROTEIN OPRF-ATOX *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* AND ASSESSMENT OF ITS PROTECTIVE PROPERTIES

Kaloshin A. A., Soldatenkova A. V., Leonova E. I., Mihailova N. A.

*The Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia*

The recombinant fusion protein OprF-aTox, which contains the amino acid residues of the outer membrane protein F (OprF) and the truncated form of exotoxin A *Pseudomonas aeruginosa*, has been obtained. It was revealed that the obtained protein OprF-aTox protected the mice from experimental infection induced by strain PA103 of *P. aeruginosa*. The fusion protein OprF-aTox after two immunizations was more effective in comparison with recombinant proteins OprF and toxoid that were injected alone or in the complex. This opens up the prospect of using the fusion protein OprF-aTox for creating *Pseudomonas* vaccine.

*Key words:* *Pseudomonas aeruginosa*, outer membrane protein F (OprF), exotoxin A, toxoid, recombinant protein, immunization.

---

---

## ГЕНОИНЖЕНЕРНЫЕ ИММУНОТРОПНЫЕ БИОПРЕПАРАТЫ У БОЛЬНЫХ РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ В УСЛОВИЯХ РЕАЛЬНОЙ КЛИНИЧЕСКОЙ ПРАКТИКИ

Жиляев Е. В.<sup>1,2</sup>, Кольцова Е. Н.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Европейский медицинский центр; <sup>2</sup>Российская медицинская академия  
постдипломного образования, Москва, Россия

Эффективность и длительность применения иммунотропных генноинженерных биопрепаратов исследовалась в рамках Московского единого регистра артритов (МЕРА). Выявлено, что база данных регистра позволяет своевременно оптимизировать базисную терапию РА и проводить замену недостаточно эффективных иммуномодуляторов. Наибольшая длительность терапии отмечалась у пациентов, принимавших ингибитор Т-клеточной ко-стимуляции абатацепт.

*Ключевые слова:* ревматоидный артрит, генноинженерные биопрепараты.

Аномальное взаимодействие Т-, В-лимфоцитов и антигенпрезентирующих клеток, запускаящее каскад аутоиммунных реакций при ревматоидном артрите (РА) послужило научным основанием для применения при РА иммуно-тропных субстанций: антицитокиновых препаратов, моноклональных антител к мембранным молекулам межклеточного взаимодействия, большинство из которых производится методами генной инженерии. Количество генноинженерных биологических препаратов (ГИБП) при РА неуклонно возрастает во многом из-за недостаточной эффективности традиционной базисной терапии. В то же время, терапия ГИБП не лишена серьезных побочных эффектов, сре-

ди которых инфекционные осложнения, туберкулез, онкозаболевания, другие аутоиммунные процессы. Алгоритм применения ГИБП при РА: длительность применения, интервалы между курсами, замена одного препарата на другой при неэффективности лечения требует дальнейшей разработки. Важным источником информации, позволяющим оптимизировать эффект ГИБП в условиях реальной клинической практики, являются т.н. регистры – базы данных, содержащие сведения о больных РА, принимающих ГИБП. Московский Единый Регистр Артритов (МЕРА) с 2012 года собирает данные о больных РА, получающих лечение ГИБП на амбулаторном этапе.

**Целью работы** стала общая оценка эффективности ГИБП при РА в рамках регистра МЕРА и оценка длительности применения различных видов ГИБП

**Материалы и методы:** В рамках настоящей работы проанализированы данные о больных РА, входящих в «МЕРА». Учитывали демографические показатели, данные о течении РА (дебют, дата установления диагноза, характер начала заболевания, симптомы РА: повышение температуры, потеря массы тела, слабость, боль, припухлость суставов, связь РА с инфекциями различной локализации и другими факторами).. Оценка велась по количеству эпизодов применения ГИБП, а так же данным, собранным из анамнеза больных и медицинской документации. Было проанализировано 394 эпизода применения ГИБП. Использовались следующие группы препаратов: ингибиторы ФНО- $\alpha$  (адалимуаб, инфликсимаб, этанерцепт, цертолизумаб пэгол), моноклональные антитела, к В-клеточному рецептору CD-20 (ритуксимаб), блокатор костимуляции Т-лимфоцитов (абатацепт), блокаторы интерлейкина-6 (тоцилизумаб). Средний возраст пациентов во всех группах был 51-57 лет, средний возраст дебюта РА – 37-40 лет. В 320 случаях у больных выявлялся ревматоидный фактор.

**Результаты и обсуждение.** Анализ изменения степени активности РА по данным индекса DAS28 показывает положительную динамику. Так, к последнему выполненному визиту DAS-ремиссия была достигнута 40,7% больных, получавших ГИБП. Значимое клиническое улучшение было отмечено и у лиц, которым лечение ГИБП к моменту включения в регистр МЕРА уже проводилось на протяжении длительного времени в среднем – 19,8 месяцев. Возможное объяснение этому – активное использование данных регистра для своевременной коррекции традиционной базисной терапии (32,7% среди лиц, получавших ГИБП) и учащение смены не-

достаточно результативных ГИБП (37,2%). Для интегральной оценки длительности, а, следовательно, переносимости и эффективности ГИБП в 394 эпизодах был использован статистический метод Каплан-Майера. По нашим данным: усредненная максимальная длительность применения препарата «Survival time» (ST) составила 1655.07 при степени достоверности (PI) 95% и она отмечалась в группе пациентов, получавших абатацепт, минимальная ST – 563.70 (PI 95%) в группе больных, принимавших адалимуаб. ST других ГИБП: инфликсимаб – 828.08, ритуксимаб – 588.64, тоцилизумаб – 909.56, цертолизумаб пэгол – 847.42 находились между указанными цифрами. По данным МЕРА- замена ГИБП на второй препарат отмечалась в 43 случаях, на третий – в 12 случаях, на четвертый – в 2 случаях, и на пятый и шестой – по одному случаю. Отмечено снижение эффективности лечения с каждым последующим применением ГИБП. Демографические факторы не имели значительного влияния на длительность применения препаратов

Таким образом, данные, собранные в регистре МЕРА позволяют оптимизировать терапию ГИБП у больных РА, в том числе тех, кто получал генноинженерные препараты уже к моменту включения в регистр. Абатацепт, блокатор костимуляторного сигнала Т-клеточной активации, достоверно отличался наибольшей продолжительностью применения в реальной клинической практике, в связи с эффективностью и наименьшим риском побочных эффектов, что подтверждает данные мировой практики [1,2].

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Schiff M, Weinblatt ME, Valente R et.al. Ann Rheum Dis. 2014 Jan;73 (1):86-94
2. Mark C. Genovese, Jean-Claude Becker, Michael Schiff, et.al. N Engl J Med., 2005; 353:1114-1123

### IMMUNOTROPIC BIOLOGICS IN REAL CLINICAL PRACTICE CONDITIONS OF RHEUMATOID ARTHRITIS TREATMENT

Zhiliyaev E. V.<sup>1,2</sup>, Koltsova E. N.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>European Medical center; <sup>2</sup>Russian Medical Academy of postgraduate education, Moscow, Russia

The efficacy and adverse effects of immunotropic biologics in Rheumatoid arthritis (RA) were studied in framework of Moscow United Registry of Arthritis (MERA). The registry data allowed to optimize RA immunotropic treatment regimens. T-cell The longest duration of biologics therapy was found in RA patients group treated by T-cells costimulation inhibitor Abatacept.

**Key words:** Rheumatoid arthritis, immunotropic biologics.

## МЕТОД ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО ФОТОЛИЗА ХИМИЧЕСКИ ЗАПАКОВАННЫХ СОЕДИНЕНИЙ С ПРИМЕНЕНИЕМ УФ-ЛАЗЕРА

Коркотян Э.<sup>1,2</sup>, Сегал М.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Биологический факультет, ПГНИУ, Пермь, Россия; <sup>2</sup>Отдел нейробиологии,  
Институт им. Вейцмана, Реховот, Израиль

Используя импульсы ультрафиолетового (УФ) лазера и конфокальный сканирующий микроскоп, мы описываем относительно дешевый, точный и эффективный метод быстрого импульсного внутриклеточного фотолиза запакованных молекул в синаптических микро-доменах культивируемых нейронов гиппокампа. Лазерный свет вводится посредством рабочей оптики, локализуется параллельным красным лазером и способен создать сферическую область фотолиза размером менее 1 мкм<sup>3</sup>. Воздействие УФ лазера вызывает локальный и моментальный фотолиз в головках грибовидных дендритных шипиков. Внутриклеточная распаковка кальция и флуоресцеина применена для иллюстрации различной химической природы и физиологической значимости этих молекул при исследовании процессов субмикронной диффузии.

**Ключевые слова:** запакованные соединения, фотолиз, дендритные шипики, микро-домен, кальций, ультрафиолетовый лазер.

Локальная химическая стимуляция живой ткани в условиях *in vitro* является одной из наиболее актуальных методологических проблем современной биологии. В первую очередь это касается исследований, проводимых на возбудимой ткани в случае внешнего воздействия на клеточную мембрану [1], однако, может быть распространено и на иные типы клеток, например, иммунокомпетентных, при экспериментальном вмешательстве в каскады биохимических процессов, связанных с регуляцией вторичных мессенджеров и внутриклеточного кальция. [2]. Биологически активные агенты могут быть доставлены к культивируемой клетке-мишени несколькими способами, например, вместе с омывающим ее раствором или при помощи локального релиза из стеклянной микропипетки, направляемой манипулятором, посредством ионофореза или под давлением [3]. Так или иначе, реагент должен обладать способностью к пассивному преодолению биомембраны, либо внедряться непосредственно в клетку. Но и в этом случае воздействию подвергнется вся клетка целиком или их группа в зоне стимуляции. Дозированное воздействие веществ затруднено или исключено. Одним из способов решения опи-

санной проблемы является применение так называемых запакованных фото-активируемых соединений. Данный способ основан на химической «запаковке» практически любого активного вещества, что делает его биологически нейтральным, причем таким образом, чтобы оно могло быть «распаковано» и возвращено к первоначальному активному состоянию при помощи короткой вспышки сфокусированного луча света от ультрафиолетового (УФ) источника, например, УФ-лазера. Метод УФ-фотолиза известен около 15 лет и применяется для внеклеточной активации нейромедиаторов, например, глутамата. [4, 5]. В то же время, вопрос о внутриклеточной доставке и распаковке фото-активируемых веществ в области микро-доменов остается открытым.

**Цель исследования:** разработка метода внутриклеточной распаковки фото-активируемых соединений в наносекундном временном диапазоне и в клеточных микро-доменах объемом менее одного мкм<sup>3</sup>.

**Материал и методы.** В качестве объекта исследования применялась примарная культура нейронов и глии гиппокампа крысы, приготовленная в соответствии с ранее изложенным методом [6].

**Оборудование.** В качестве платформы использовался прямой сканирующий конфокальный микроскоп (Pascal, Zeiss), оснащенный аргоновым и гелий-неоновым лазерами (488 и 543нм). Фотолиз осуществлялся лазером ND: YAG (New Wave Inc.), чья третья гармоника генерировалась в виде световых импульсов: 355нм, 3,6 мДж, 4,0нс, 1Гц. Адресация вспышек УФ в микроскоп осуществлялась посредством дихроичного зеркала с высокой отражающей способностью в области 355нм, но прозрачного в видимом спектре (Locus, Optical Devices & Elements Ltd). Вспышки фокусировались в плоскости изображения посредством рабочего объектива Achromplan 63×0.9NA, погруженного в среду. Из-за хроматических aberrаций УФ фокусировался на 20 мкм ниже видимого света. Для исправления aberrации применялась линза KPX073 EFL-250 mm (Newport). Для пространственной настройки УФ применялся дополнительный красный неоновый лазер (Melles Griot) (1мВ, 632нм), свет которого вводился в оптическую ось УФ лазера посредством одного из ослабляющих УФ светофильтров в роли дихроичного зеркала. УФ и 632нм лучи направлялись в микроскоп оптическим элеватором, состоящим из двух высокоэнергетических зеркал Y3-1025-45-P (CVI Laser corporation). Три УФ светофильтра оптической плотностью в 0.5, 1 и 2, ослабляли световой поток в 3, 10 и 100 раз (CVI Laser Corporation), что соответствовало общей аттенюации в 3000 раз, до 1.2 мкДж. Стеклообразные элементы оптической системы микроскопа дополнительно ослабляли его до 300 нДж, что соответствует  $6 \times 10^{11}$  фотонов на импульс, сфокусированный в объеме среды менее 1 фл ( $< 1 \text{ мкм}^3$ ).

**Запакованные соединения.** NP-EGTA ( $\text{C}_{32}\text{H}_{43}\text{N}_3\text{O}_{20}$ ) (Molecular Probes Inc.) является таковой производной хелатора кальция – ЭГТА, чье сродство с  $\text{Ca}^{2+}$  снижается с 80нМ до  $> 1\text{мМ}$  под действием УФ. Дополнительная модификация: NP-EGTA AM способна пассивно преодолевать клеточную мембрану и накапливаться в клетке, преобразуясь в NP-EGTA под действием эндогенных эстераз. После двухчасовой инкубации в 10 мкМ растворе при комнатной температуре, его концентрация в клетке достигала  $\sim 600 \text{ мкМ}$ .

Дикалиевая соль CMNB-caged fluorescein (CMNB-cf) (Molecular Probes) является запакованным флуоресцеином, способным к свечению только после фотолиза. При дис-

социации в водном растворе, его молекула заряжается отрицательно и не проходит сквозь клеточную мембрану. Для доставки в клетку его 5мМ раствора, применялся ионофорез через тонкую стеклянную микропипетку (10-20 МОм, -10В, 2-3с).

**Визуализация.** После двухнедельного роста на 13мм покровном стекле, культура нейронов помещалась на моторизованный столик микроскопа в рабочий раствор, содержащий (в мМ): NaCl 129, KCl 4,  $\text{MgCl}_2$  1,  $\text{CaCl}_2$  2, глюкоза 4.2, HEPES 10, pH доводился до 7.4 посредством NaOH, а осмотическое давление – сахарозой. Для блокады спонтанной активности нейронов применялся тетродотоксин (1мкМ). Визуализация цитоплазматических ионов кальция осуществлялась при помощи внутриклеточного введения флуоресцентного индикатора Fluo-4 (Molecular Probes) (5мМ в микропипетке) светом аргонового лазера (488нм). В качестве морфологического маркера применялся красный флуоресцентный белок DsRed, ген которого, в составе плазмиды, внедрялся в клетку методом трансфекции липофектамина за неделю до эксперимента. Для его возбуждения применялся гелий-неоновый лазер (543нм). Для быстрой визуализации  $\text{Ca}^{2+}$  и флуоресцеина применялся метод сканирования единичной линии со скоростью 0.7 мс/линия вдоль микро-домена, состоящего из головки дендритного шипика, его ножки и прилежащего дендрита. Работа микроскопа синхронизировалась с ND: YAG лазером, испускающим УФ. Комплексная обработка данных осуществлялась при помощи программы, созданной нами среде MATLAB R2010b.

**Результаты и обсуждение.** В экспериментах применялись нейроны, заправленные NP-EGTA вместе с индикатором Fluo-4, либо CMNB-cf, а также экспрессирующие белок DsRed. Морфологическая идентификация микро-доменов осуществлялась благодаря красному свечению белка. Для точного нацеливания УФ луча, на головке шипиков объемом около  $1 \text{ мкм}^3$  фокусировался свет вспомогательного красного лазера. Сигнал индикатора  $\text{Ca}^{2+}$  Fluo-4 или флуоресцеина регистрировался в зеленой области спектра, при активации лазером с длиной волны 488нм. Базовый уровень флуоресценции в обоих случаях оставался стабильным. На фоне одиночного импульса УФ лазера, нацеленного на головку шипика, в ней наблюдалось мгновенное (быстрее 0.7 мс)

повышение уровня флуоресценции. В случае фотолиза молекулы NP-EGTA, удерживаемый ею  $\text{Ca}^{2+}$  выделялся в цитоплазму шипика, где соединялся с индикатором кальция, что вызывало флуоресценцию последнего от света лазера. Флуоресцеин сам по себе производит свечение, будучи освещенным лазером в указанном спектре. Его активация объясняется фотолизом, вследствие оптической распаковки CMNB-сф. В обоих случаях, при небольшом сдвиге луча УФ от зоны головки шипика за пределы мембраны, в область межклеточного пространства, рост флуоресценции полностью прекращался. Напротив, если луч смещался в сторону ножки шипика или к дендриту, свечение возникало в соответствующих доменах.

Наконец, физиологическое значение генерируемых сигналов определялось динамикой спада сигнала. В случае внутриклеточного релиза ионов  $\text{Ca}^{2+}$ , их свободное распространение ограничивается следующими факторами: помпами и ионными обменниками, откачивающими кальций наружу, эндогенными буферными белками, переводящими его в связанную форму, а также работой внутриклеточных кальциевых депо. В силу этого, повышенный уровень  $\text{Ca}^{2+}$  в дендритных шипиках ограничивался весьма коротким временем в 10-15 мс, после чего свечение возвращалось к исходному уровню. Какой-либо значительной диффузии  $\text{Ca}^{2+}$  в дендрит также не на-

блюдалось. Напротив, молекула флуоресцеина является физиологически нейтральной для клетки и не подвергается ни буферизации, ни быстрому удалению. Единственным путем, по которому молекула распакованного флуоресцеина может покинуть дендритный шипик является диффузия в прилежащий дендрит. По этой причине свечение флуоресцеина после фотолиза длится в течение 1–2 с (в зависимости от длины и толщины ножки шипика) и медленно спадает, переходя (по мере диффузии флуорофора) в область дендрита.

Таким образом, разработанный нами метод внутриклеточного фотолиза запакованных соединений действует практически мгновенно, максимально локально ( $<1 \text{ мкм}^3$ ) и может быть применен для решения широкого круга задач, требующих тонкого биохимического воздействия на клетку.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Korkotian E., Segal M. Cell Calcium 2006. 40. 441-449
2. Ernst I., Fliegert R., Guse A.H. Front Immunol. 2013. 4 (259)
3. Murnick G. J., Dube G., Krupa B., Liu G. J Neurosci Methods. 2002. 116. 65-75.
4. Augustine G. J. Nat Neurosci. 2001. 4. 1051–2.
5. Korkotian E., Oron D., Silberberg Y., Segal M. Journal of Neuroscience Methods 2004. 133. 153-159.
6. Korkotian E., Segal M. Journal of Neurosci. 1997. 17 (5). 1670-1682.

#### METHOD OF INTRACELLULAR PHOTOLYSIS OF CAGED COMPOUNDS USING UV LASER

E. Korkotian<sup>1,2</sup>, M. Segal<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Biological Faculty, Perm State University, Russia; <sup>2</sup>Department of Neurobiology, The Weizmann Institute, Rehovot, Israel

Using a pulsed ultraviolet (UV) laser in a confocal scanning microscope, we present a relatively cheap, accurate and efficient method for fast UV laser intracellular flash photolysis of caged molecules in the synaptic micro-domains of cultured hippocampal neurons. The laser light is introduced through the imaging optics, can be localized by a parallel red laser and can photolyse a sphere of less than  $1 \text{ }\mu\text{m}^3$ . The application of UV light evokes local and ultrafast photolysis in the heads of mushroom dendritic spines of the imaged neurons. Intracellular uncaging of caged calcium and fluorescein is used to illustrate a different chemical properties and physiological relevance of these two molecules in the sub-micron resolution diffusion studies.



## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ РАЗЛИЧНЫХ СПОСОБОВ ДОСТАВКИ АНТИГЕННОГО МАТЕРИАЛА В ДЕНДРИТНЫЕ КЛЕТКИ ДЛЯ СТИМУЛЯЦИИ ЦИТОТОКСИЧЕСКОЙ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ РЕАКЦИИ В КУЛЬТУРЕ МОНОНУКЛЕАРНЫХ КЛЕТОК БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Курилин В. В.<sup>1</sup>, Шевченко Ю. А.<sup>1</sup>, Христин А. А.<sup>1,2</sup>,  
Облеухова И. А.<sup>1</sup>, Куликова Е. В.<sup>1</sup>, Хантакова Ю. Н.<sup>1</sup>,  
Сидоров С. В.<sup>2</sup>, Сенников С. В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии»; <sup>2</sup>ГБУЗ Городская клиническая больница № 1, Новосибирск, Россия

Разные способы доставки антигенного материала (лизат и РНК опухолевых клеток) в дендритные клетки сопоставимо стимулируют цитотоксическую клеточную реакцию против аутологичных опухолевых клеток и секрецию цитокинов IFN $\gamma$  и IL-6 в совместной культуре моноклеарных клеток. Эти результаты свидетельствуют о формировании эффективного Th1-ответа, способствующего активации противоопухолевого иммунного ответа.

**Ключевые слова:** дендритные клетки, лизат и РНК опухолевых клеток, цитотоксичность, цитокины.

Успехи современной онкоиммунологии являются непосредственным результатом понимания основных механизмов развития противоопухолевого иммунного ответа и открытия ряда опухолевых антигенов, которые способны распознаваться антителами и Т-клетками.

Уникальная иммуномодулирующая активность дендритных клеток (ДК) сделала их привлекательной моделью для иммунотерапевтической стимуляции иммунного ответа как *in vitro*, так и с последующим возможным использованием *in vivo* [1]. ДК способны доставлять опухолевые антигены, полученные из различных источников, что позволяет эффективно привлекать эффекторные иммунокомпетентные клетки для запуска элиминации опухоли. В качестве антигенов используют лизаты и мРНК опухолевых клеток, рекомбинантные белки опухоль-ассоциированных антигенов, а также ДНК-конструкции, кодирующие опухоль-ассоциированные антигены [2].

Существующие способы доставки (лизат, РНК, ДНК-конструкции) широко применяются для создания клеточных вакцин на основе дендритных клеток, однако у каждого способа

(антигенного материала) есть свои преимущества и ограничения по их использованию.

Целью работы являлась оценка эффективности стимуляции иммунного ответа в культуре моноклеарных клеток в зависимости от способа доставки антигенного материала в виде лизата или РНК опухолевых клеток в дендритные клетки больных раком молочной железы.

**Методы.** В работе использовали периферическую кровь и образцы опухоли у 11 пациентов с раком молочной железы I–II стадии, проходивших лечение на базе ГКБ № 1 г. Новосибирска, забор материала выполнен с информированного согласия пациентов. Для получения зрелых ДК у больных выделяли моноклеарные клетки (МНК) из периферической крови стандартным методом на градиенте фикола-урографина ( $\rho=1,077$  кг/см<sup>3</sup>). Из полученных МНК выделяли клетки с повышенной способностью к адгезии посредством инкубации в течение 2ч в среде RPMI-1640 («Биолот», Россия) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Hyclone), 40 мкг/мл гентамицина (KRKA, Словения), 200 ЕД/мл

бензилпенициллина (ЗАО «Синтез» Курган), 2 мМ L-глутамин (Биолот, Россия),  $5 \times 10^{-5}$  М2-меркаптоэтанол HEPES (Sigma, США), 10 мМ HEPES (Sigma, США) (далее полная среда RPMI-1640) при 5% CO<sub>2</sub> и 37°C. К прилипшей фракции МНК добавляли 50 нг/мл rhGM-CSF, 100 нг/мл rhIL-4 (Biovision, США) для получения незрелых ДК на протяжении 4 сут. Антигенный опухолевый материал доставляли в ДК двумя способами: пассивным захватом лизата опухолевых клеток (ДК-лизат) и магнитной трансфекцией общей РНК опухолевых клеток (ДНК-РНК). При использовании лизата, его добавляли к незрелым ДК в концентрации 100 мкг/мл. РНК трансфицировали в зрелые ДК посредством набора «MATra-A» для магнитной трансфекции (PromoKine, США). Контролем были ДК, ненагруженные антигенами опухолевых клеток и МНК. Для созревания в течение последующих 24 ч в культуру вносили 25 нг/мл rhTNFα (ФГБУН ГНЦ «Вектор», Новосибирск) в свежей порции культуральной среды эквивалентного объема.

Оценку фенотипа ДК проводили методом проточной цитометрии на приборе FACS Aria (BD, США), с использованием соответствующих моноклональных антител CD3-FITC, CD14-PE, HLA-DR-FITC, CD11c-PE, CD209-PerCP-Cy5.5, CD86-FITC, CD83-PE (BD, США). Способность ДК к эндоцитозу, как показатель функциональной активности, оценивалась по захвату FITC-декстран (Sigma) на проточном цитофлюориметре FACS Aria (BD, США) [3]. Фракцию неприлипших клеток сохраняли в полной среде RPMI-1640 при 5% CO<sub>2</sub> и 37°C до проведения процедуры ссаживания. Совместное культивирование ДК и МНК проводили в параллельных культурах в соотношении ДК: МНК – 1:10 для последующего проведения различных функциональных тестов. Опухолевые клетки получали путём механической гомогенизации образца опухоли, а лизат – путём 3-х циклов замораживания-оттаивания. РНК из опухолевых клеток выделяли методом фенольно-хлороформной экстракции. Общую концентрацию белка в лизате и РНК определяли на приборе «NanoDrop» (Thermo Scientific, США). Цитотоксический эффект оценивали по содержанию лактатдегидрогеназы в кондиционной среде, полученной при совместном культивировании МНК, ДК, и опухолевых клеток, согласно инструкции производителя набора (CytoTox 96® Non-

Radioactive cytotoxicity Assay, Promega, США). Содержание иммунорегуляторных цитокинов интерферона-γ (IFN-γ), IL-4, IL-6 и IL-10 в кондиционных средах совместных культур МНК с ДК оценивали с помощью иммуноферментного анализа с применением соответствующих коммерческих тест-систем производства «Вектор-Бест» согласно протоколу производителя. Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы «Statistica 6.0». При ненормальном распределении выборки для статистической проверки использовали непараметрический критерий Уилкоксона.

**Основные результаты.** Полученные при культивировании ДК с использованием цитокинов (rhGM-CSF, rhIL-4, TNFα) характеризовались увеличением экспрессии маркеров созревания CD83, CD83/CD86 и снижением экспрессии CD14 и захвата FITC-декстрана, что свидетельствует об эффективности используемого протокола для получения культуры зрелых ДК. Основной задачей стимуляции протективного противоопухолевого иммунитета является увеличение эффективности цитотоксической реакции против аутологических опухолевых клеток. В результате проведенного эксперимента установлено, что ДК-лизат или ДК-РНК, значимо стимулируют цитотоксическую реакцию МНК против опухолевых клеток по сравнению с контрольными группами в 1,7 и 2,7 раза, достигая значений 30% и 50% соответственно. При сравнении между собой групп МНК, сокультивированных с ДК-лизат или ДНК-РНК, не выявлено значимых различий.

В реализации цитотоксического эффекта лимфоцитов против опухолевых клеток активно участвуют различные иммунорегуляторные молекулы (например: IFNγ, IL-4, IL-6 и IL-10). Применение ДК-лизат или ДК-РНК вызывает повышение секреции IFNγ и IL-6 МНК по сравнению с контрольными группами. Также было выявлено, что ДК-лизат и ДК-РНК не стимулировали продукцию IL-10 при совместном культивировании с МНК, по сравнению с группой ДК, без нагрузки опухолевыми антигенами, что позволяет предположить отсутствие появления IL-10-продуцирующих Т-клеток, которые участвуют в формировании толерантности на опухоль-ассоциированные антигены собственных тканей пациента. Концентрация IL-4 в совместных культурах

определяли на уровне пороговых значений, и не имело значимых различий по сравнению с контрольными группами.

Таким образом, при культивировании зрелых аутологичных ДК, нагруженных антигенами опухолевых лизатов или РНК, происходит лизис опухолевых клеток, наработка и секреция цитокинов  $IFN\gamma$  и IL-6, что свидетельствует о формировании эффективного Th1-ответа, способствующего активации противоопухолевого иммунного ответа. При сравнении влияния на стимуляцию противоопухолевой иммунной реакции двух разных способов доставки опухолевых антигенов (лизат и РНК опухолевых клеток) в ДК, было продемонстрировано, что оба способа в равной степени стимулируют как лизис опухолевых клеток, так и секрецию цитокинов, способ-

ствующих реализации эффективного противоопухолевого цитотоксического ответа.

Работа поддержана ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 годы» (Соглашение № 14.607.21.0043). Уникальный идентификатор RFMEFI60714X0043.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Palucka K., Banchereau J. Cancer immunotherapy via dendritic cells. *Nat Rev Cancer*. 2012 Mar 22;12(4):265-77.
2. Шевченко Ю. А., Хантакова Ю. Н., Курилин В. В. и др. *Иммунология*. – 2013. – Т. 134. – № 6. – С. 327-330
3. Obermaier B., Dauer M., Herten J. et al. *Biol Proced Online*, 2003, Vol. 5, pp. 197-203.

#### USING DIFFERENT METHODS OF DELIVERY OF ANTIGENIC MATERIAL INTO DENDRITIC CELLS TO STIMULATE CYTOTOXIC ANTITUMOR RESPONSE IN THE CULTURE OF MONONUCLEAR CELLS

Kurilin V. V.<sup>1</sup>, Shevchenko J. A.<sup>1</sup>, Khristin A. A.<sup>1,2</sup>,  
Obleukhova I. A.<sup>1</sup>, Kulikova E. V.<sup>1</sup>, Khantakova J. A.<sup>1</sup>,  
Sidorov S. V.<sup>1</sup>, Sennikov S. V.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Federal State Budgetary Scientific Institution «Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology»; <sup>2</sup>City Clinical Hospital № 1, Novosibirsk, Russia

Different methods of delivery of the antigenic material (the lysate of tumor cells and RNA) is comparable to the dendritic cells stimulate cytotoxic cellular response against autologous tumor cells and the secretion of cytokines  $IFN\gamma$ , and IL-6 in the co-culture of mononuclear cells. These results indicate the formation of an effective Th1-response, promotes activation of antitumor immune response.

## ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫХ КЛЕТОК И МОРФОЛОГИЯ ЛИМФОИДНЫХ ОРГАНОВ МЫШЕЙ ПРИ ВВЕДЕНИИ РАСТИТЕЛЬНОГО ИММУНОМОДУЛЯТОРА

Лебединская О. В.<sup>1</sup>, Лебединская Е. А.<sup>1</sup>, Макаренко И. Д.<sup>2</sup>,  
Ахматова Н. К.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ГБОУ ВПО «Пермский государственный медицинский университет  
имени академика Е. А. Вагнера» МЗ РФ, Пермь; <sup>2</sup>ГБФУ НИИ Вакцин и сывороток  
им. И. И. Мечникова, Москва, Россия

Изучено влияние сульфатированного полисахарида – фукоидана из бурой водоросли *Laminaria japonica* на морфологическую характеристику лимфоидных органов, субпопуляционный состав мононуклеарных лейкоцитов, продукцию цитокинов и цитотоксическую активность спленоцитов мышей. Установлено, что фукоидан способствует активации гемопоеза и пролиферации лимфоидных клеток в первичных и вторичных органах иммуногенеза, увеличению экспрессии маркеров CD19, NK, NKT, CD25, MHC II, TCR, TLR2 и TLR4, цитотоксической активности спленоцитов и продукции иммунорегуляторных и провоспалительных цитокинов, что свидетельствует об активации эффекторных механизмов врождённого иммунитета и развитии адаптивного иммунного ответа по Th-1 типу.

**Ключевые слова:** фукоидан, врождённый иммунитет, морфология лимфоидных органов, цитокины, цитотоксическая активность.

В настоящее время для стимулирования защитных механизмов в медицине используется большое количество растительных препаратов, которые проявляют иммуномодулирующую активность [4, 5]. Растительные иммуномодуляторы совместно со стандартной терапией ускоряют выздоровление, снижают частоту рецидивов [4]. Перспективными растительными иммуномодуляторами, которые применяются при иммунотерапии инфекционных и аутоиммунных заболеваний, а также злокачественных новообразований, служат агонисты Toll-подобных рецепторов (Toll like receptors – TLR) [1].

Одним из таких иммуномодуляторов является фукоидан *japonica* – препарат, созданный на основе бурых морских водорослей. Он обладает иммуномодулирующей активностью в отношении различных иммунокомпетентных клеток: лимфоцитов, дендритных клеток, натуральных киллеров и нейтрофилов, играет важную роль в противоопухолевой защите, а также обеспечивает мобилизацию гематопоетических стволовых клеток [2, 3]. Однако

сведений о влиянии фукоидана на морфологические особенности лимфоидных органов и функциональные свойства иммунокомпетентных клеток недостаточно.

**Цель исследования** – изучить влияние фукоидана на иммунофенотипические и функциональные характеристики мононуклеарных лейкоцитов (МЛ) селезёнки, на структуру и клеточный состав лимфоидных органов мышей.

**Материалы и методы.** В работе применялся очищенный фукоидан, полученный из морских водорослей *Laminaria japonica* Areshoug и *Kjellmaniella gyrate* Miyabe. Эксперименты проводили на мышах линии СВА в двух группах. Первую (контрольную) составляли интактные животные, во вторую (опытную) входили мыши, получавшие фукоидан внутрибрюшинно в дозе 200 мкг на мышь. Выделение мононуклеарных лейкоцитов осуществляли по общепринятой методике в градиенте плотности фиколл-урогафин (Pharmacia, США, плотностью 1,077 г/см<sup>3</sup>), образовавшие интерфазное кольцо, собирали пипеткой и концентрацию клеток довели до 1·10<sup>6</sup> кл/мл.

Оценку субпопуляционной структуры лимфоцитов проводили методом проточной цитометрии с применением моноклональных антител (МКА) (Caltag Laboratories, США) против клеточных антигенов (CD3, NK1.1., CD3/NK1.1., CD4, CD25, CD4/CD25, CD8a, I-AK, CD19, CD5.2, CD40, CD5.2/CD40). Анализ иммунофенотипа МЛ проводился также при введении в культуры спленоцитов изучаемого препарата – фукоидана *jaronica* – в дозе 10 мкг/мл. Концентрацию цитокинов в сыворотке крови определяли иммуноферментным методом с использованием тест-систем фирмы Bender MedSystems (США) согласно инструкции производителя. Цитотоксическую активность селезёночных МЛ выявляли на NK-зависимой линии клеток эритробластного лейкоза К-562 в тесте восстановления 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил) – 2,5-дифенилтетразолия бромид (МТТ-тест).

Парафиновые срезы кроветворных и лимфоидных органов (красного костного мозга, тимуса, селезёнки и лимфатических узлов), забранных через 4 и 24 часа после введения препарата, окрашивали гематоксилином и эозином, по методу Ван Гизона, метиловым зелёным и пиронином по Браше и Шифф-йодной кислотой по Мак-Манусу. Статистическую обработку данных проводили с применением *t*-критерия Стьюдента, используя стандартный пакет статистических программ Windows 2003 (StatSoft 6.0).

**Результаты исследования.** После введения фукоидана в культуры МЛ селезёнки мышей в культуральной взвеси статистически значимо увеличивается количество натуральных киллеров, НКТ-клеток, активированных Т-хелперов, В-лимфоцитов. Обращает на себя внимание выраженная экспрессия толл-подобных рецепторов (TLRs) на поверхности клеток.

Иммунофенотипический анализ показал, что внутрибрюшинное введение животным фукоидана приводит к увеличению в селезёнке в 1,5-2 раза числа натуральных киллеров (NK1.1<sup>+</sup>) и натуральных киллеров – Т-клеток (НКТ – CD3<sup>+</sup>/NK1.1<sup>+</sup>), в 2-6 раз – количества активированных Т- и В-лимфоцитов (CD25<sup>+</sup>). Полученные результаты указывают на возможное влияние фукоидана на процессы активации клеток, участвующих в антителообразовании, включая антигенпредставляющие клетки и Т-хелперы, так и на дифференцировку В-лимфоцитов в зрелые антителопроду-

центы. Всё это выражается в усилении гуморального иммунного ответа.

Для фукоидана характерна дозозависимая активация цитотоксичности при введении его в культуры мононуклеарных лейкоцитов. Максимальная цитотоксическая активность МЛ (39,0±0,6%) отмечена при концентрации фукоидана в культуральной жидкости в дозе 10 мкг/мл. Исследование цитотоксической способности мононуклеарных лейкоцитов селезёнок мышей по отношению к NK-чувствительной опухолевой линии К-562 после внутрибрюшинного введения фукоидана показало, что после некоторого снижения индекса цитотоксической активности МЛ через 4 часа после введения препарата в дальнейшем наблюдается повышение данного показателя, достигающего максимальных значений через 24 часа после инъекции фукоидана.

При изучении уровня цитокинов в сыворотке крови мышей при внутрибрюшинном введении фукоидана установлено, что под влиянием иммуномодулятора только через 96 часов после инъекции возрастает экспрессия IL-6, IL-10 и в значительной степени – TNF-α (в 40 раз).

Морфологические исследования выявили, что под влиянием фукоидана происходит активация как лимфоидного, так и миелоидного ростков. Об этом свидетельствуют признаки активного гемопоэза в красном костном мозге, пролиферативных процессов в лимфоидной ткани и первичных (тимус), и вторичных (селезёнка, лимфатические узлы) органов иммуногенеза. Причём пролиферация лимфоидных клеток наблюдается в равной степени в Т- и В-зависимых зонах вторичных органов и в корковом веществе долек тимуса. Обращает на себя внимание выраженный характер макрофагальной реакции в селезёнке и лимфатических узлах при внутрибрюшинном введении препарата.

Таким образом, проведённые исследования показали, что иммуномодулятор растительного происхождения – фукоидан *jaronica* – модулирует активность эффекторов врождённого и адаптивного иммунитета и приводит к пролиферации лимфоидных клеток в первичных и вторичных лимфоидных органах. Перспективность использования этого иммуномодулятора в биотерапии определяется также его способностью стимулировать экспрессию толл-подобных рецепторов на поверхности мононуклеарных лейкоцитов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кузнецова Т. А., Агафонова И. Г., Крохмаль Т. С., Звягинцева Т. Н., Филонова Н. В. Тихоокеанский медицинский журнал. – 2010. – № 4. – С. 32-35.
2. Choi E. M., Kim A. J., Kim Y. O., Hwang J. K. J. Med. Food. – 2005. – V. 8. – P. 446-453.
3. Frenette P. S., Weiss L. Blood. – 2000. – V. 96. – P. 2460-2468.
4. Hemant S., Yaseen K. Pharmacognosy Reviews. – 2007. – V. 1. – Issue 2. – P. 248-260.
5. Kumar S. V., Kumar S. P., Rupesh D., Nitin K. J. Chem. Pharm. Res. – 2011. – V. 3 (1). – P. 675-684.

**EFFECT OF SULFATED POLYSACCHARIDES FROM  
BROWN SEAWEED LAMINARIA JAPONICA ON THE MORPHOLOGY  
OF LYMPHOID ORGANS AND FUNCTIONAL CHARACTERISTICS  
OF THE IMMUNOCOMPETENT CELLS**

**Lebedynskaya O. V.<sup>1</sup>, Lebedynskaya E. A.<sup>1</sup>, Makarenkova I. D.<sup>2</sup>,  
Akhmatova N. K.<sup>2</sup>**

*<sup>1</sup>Perm State medical University, Perm; <sup>2</sup>The Mechnikov Research Institute  
of Vaccines and Sera, Moscow, Russia*

The effect of sulfated polysaccharide – fucoidan from the brown seaweed *Laminaria japonica* on the morphological characteristics of lymphoid organs, subpopulations of mononuclear leukocytes, cytokine production and cytotoxic activity splenocytes of mice was studied. Found that fucoidan promotes activation and proliferation of lymphoid hematopoietic cells in primary and secondary organs immunogenesis, increase expression of CD19, NK, NKT, CD25, MHC II, TCR, TLR2 and TLR4, the cytotoxic activity of splenocytes and production of immunoregulatory and inflammatory cytokines, indicating that activate the effectors mechanisms of innate immune and the development of the adaptive immune response to Th-1 type.

*Keywords:* fucoidan, innate immunity, morphology of lymphoid organs, cytokines, cytotoxic activity.

**УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ МАРКЕРОВ АКТИВАЦИИ  
ЛИМФОЦИТОВ И МОНОЦИТОВ В ОБРАЗЦАХ  
ПУПОВИННОЙ КРОВИ**

**Ляпунов В. А., Ремизова И. И., Чистякова Г. Н.,  
Устьянцева Л. С., Газиева И. А.**

*ФГБУ «Уральский научно-исследовательский институт охраны материнства  
и младенчества» Минздрава России, Екатеринбург, Россия*

С целью оценки основных популяций лимфоцитов и активированных CD95<sup>+</sup>-, CD3<sup>+</sup>CD95<sup>+</sup>- и CD14<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>-клеток проведено обследование 20 детей гестационного возраста 27-32 недель и 20 детей – с гестационным возрастом 33-36 недель. У детей меньшего срока гестации установлено снижение содержания CD3<sup>+</sup>-, CD4<sup>+</sup>-, CD8<sup>+</sup>-лимфоцитов, высокий уровень экспрессии рецептора CD95 на лимфоцитах и уменьшение количества активированных CD14<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>-моноцитов пуповинной крови, что может быть связано с низкой степенью пролиферативной активности и дифференцировки клеточных популяций к данному сроку. К гестационному возрасту 33-36 недель активизируются процессы пролиферации и дифференцировки клеток, численность лимфоцитов и моноцитов достигает уровня доношенных новорожденных.

*Ключевые слова:* пуповинная кровь, активация лимфоцитов и моноцитов

**Актуальность и цель работы.** Активированные субпопуляции лейкоцитов несут на своей поверхности специализированные молекулы, посредством которых осуществляется регуляция вступления клетки в реакции иммунитета. Маркер CD95, экспрессированный на поверхности лимфоцитов, свидетельствует о готовности клетки к апоптотическому процессу, а его лиганды (CD95L) играют важную роль в удалении активированных зрелых Т-клеток [1]. При помощи моноцитарного рецептора HLA-DR осуществляется процесс презентации антигена Т-клеткам. По данным литературы, содержание лейкоцитарного антигена моноцитов человека HLA-DR ниже у недоношенных младенцев, причем данный показатель не коррелирует с фагоцитарной активностью клеток [2]. Уменьшение экспрессии этого маркера на клеточной поверхности наблюдалось на циркулирующих моноцитах в образцах пуповинной крови после внутриутробного сепсиса [3]. Данные маркеры считаются необходимыми для адекватного иммунного ответа в эмбриональный период. Исследование основных популяций лимфоцитов и моноцитов, несущих добавочные вспомогательные сигнальные молекулы, является актуальным в области репродуктивной иммунологии.

**Цель исследования:** оценить популяционный состав лимфоцитов и содержание активированных CD3<sup>+</sup>CD95<sup>+</sup>-, CD14<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>-клеток в образцах пуповинной крови новорожденных разного гестационного возраста.

**Материалы и методы.** В ходе исследований анализировались образцы пуповинной крови 20 новорожденных с гестационным возрастом 27-32 неделя (1-я группа) и 20 детей в возрасте 33-36 недель (2-я группа). Группу сравнения составили 15 условно здоровых доношенных новорожденных. Методом проточной цитофлуориметрии определялось содержание субпопуляций лимфоцитов (CD3, CD19, CD4, CD8, CD16/56), количество клеток, позитивных по маркеру готовности к апоптозу (CD3<sup>+</sup>CD95<sup>+</sup>), а также уровень экспрессии маркера HLA-DR на моноцитах. Статистическую обработку результатов исследований проводили с использованием пакета прикладных программ Statistica 6. Данные представляли в виде медианы (Me), нижнего и верхнего квартилей (P25 и P75). Проверку статистических гипотез осуществляли с помощью непараметрического U-критерия Манна-Уитни.

Уровень значимости межгрупповых различий (p) принимали равным  $\leq 0,017$ .

**Результаты.** При сопоставлении результатов исследования основных групп и группы сравнения были идентифицированы отличия по уровню экспрессии как маркеров субпопуляций лимфоцитов, так и рецепторов активации. В образцах пуповинной крови новорожденных 1-й группы отмечалось статистически значимое снижение процентного содержания CD3<sup>+</sup>- и CD4<sup>+</sup>-клеток – 42,5 (19–47)% и 30 (14,25–36,75)% против 55 (43–57)% и 37 (32–40)% у детей 2-й группы и 60 (56–64,5)% и 45 (40–47)% в группе сравнения ( $p < 0,017$  во всех случаях). Аналогичное снижение было зафиксировано при оценке относительного содержания CD8<sup>+</sup> лимфоцитов с параметрами детей 2-й группы и доношенных новорожденных 12,0 (7,5–13,5)% против 15,0 (12,0–22,0)% и 16 (13–18)%, ( $p < 0,017$  во всех случаях). Наиболее низкое количество активированных моноцитов (CD14<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>) также регистрировалось у новорожденных 1-й группы – 45 (19,75–64,25)% против 65 (54–74)% во 2-й группе и 67,0 (64,0–72,0)% в группе сравнения ( $p < 0,01$  во всех случаях). Уровень экспрессии маркера готовности клеток к апоптозу в общем пуле лимфоцитов в группе детей меньшего гестационного возраста был статистически значимо выше по сравнению с показателями детей 2-й группы и группы сравнения – 8,5 (6,0–11,5)% против 4,5 (3,0–5,25)% и 3,5 (3–4)% соответственно, ( $p < 0,001$  во всех случаях). Аналогичная тенденция к повышению регистрировалась и для CD3<sup>+</sup>CD95<sup>+</sup>-лимфоцитов – 7,0 (5,0–9,75)% у детей 1-й группы против 3,0 (2,0–3,25)% и 1,0 (1,0–1,0)% 2-й группы и группы сравнения ( $p < 0,001$  во всех случаях). Абсолютное количество CD95<sup>+</sup>- и CD3<sup>+</sup>CD95<sup>+</sup>-лимфоцитов также было достоверно высоким у детей меньшего гестационного возраста –  $0,39 (0,25–0,62) \times 10^9/\text{л}$  против  $4,5 (3,0–5,25) \times 10^9/\text{л}$  и  $0,18 (0,11–0,21) \times 10^9/\text{л}$  соответственно, а также  $0,16 (0,08–0,19) \times 10^9/\text{л}$  против  $0,04 (0,02–0,05) \times 10^9/\text{л}$  и  $0,03 (0,02–0,05) \times 10^9/\text{л}$  ( $p < 0,001$  во всех случаях). Во 2-й группе детей все показатели иммунной системы были сопоставимы с параметрами доношенных новорожденных. В количестве NK-клеток (CD16/56) статистически значимых различий между группами детей не выявлено.

В результате проведенных исследований установлено, что у детей с гестационным воз-

растом 27-32 недели на фоне сниженной экспрессии HLA-DR моноцитами пуповинной крови и повышенном содержании лимфоцитов с маркером CD95 отмечается уменьшение количества CD3<sup>+</sup>-, CD4<sup>+</sup>- и CD8<sup>+</sup>-клеток, что является, прежде всего, показателем нарушения процессов пролиферации и дифференцировки основных субпопуляций лимфоцитов у детей, рожденных до 33-й недели. К возрасту 33-36 недель гестации активизируются процессы пролиферации и дифференцировки

клеток, численность популяций лимфоцитов и активированных моноцитов достигает уровня у доношенных детей.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Peter D. Cell Res 2010, 20 (1), 72-88.
2. Prosser A., Hibbert J., Strunk T., Kok C.H., Simmer K. et al. Pediatr Res 2013, 74 (5), 503-510.
3. Genel F., Atlihan F., Ozsu E., Ozbek E. J Infec 2010, 60 (3), 224-228.

### THE LEVEL OF EXPRESSION OF LYMPHOCYTE AND MONOCYTE ACTIVATION MARKERS IN CORD BLOOD SAMPLES

Lyapunov V. A., Remizova I. I., Chistyakova G. N.,  
Ustyantseva L. S. Gazieva I. A.

*Mother and Child Care Ural Research Institution of Russia Public Health Ministry,  
Yekaterinburg, Russia*

In order to assess the major populations of lymphocytes and activated CD95<sup>+</sup> -, CD3<sup>+</sup> CD95<sup>+</sup> - and CD14<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> -cells there were examined 20 children in gestational age 27-32 weeks and 20 children – with a gestational age of 33-36 weeks. Children of less gestational age demonstrated a reduction of CD3<sup>+</sup>-, CD4<sup>+</sup> -, CD8<sup>+</sup> lymphocytes, a high level of the CD95 receptor expression on lymphocytes and decrease in the number of activated CD14<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> monocytes in the umbilical cord blood, which can be associated with low proliferative activity and differentiation of cell populations by this time. By gestational age of 33-36 weeks the processes of cell proliferation and differentiation are activated, the number of lymphocytes and monocytes approaches these in the full-term newborns.

### РОСТ ПАНКРЕАТИЧЕСКИХ КЛЕТОК В МНОГОКЛЕТОЧНЫХ 3D КУЛЬТУРАХ

Мырсыкова Е. В., Коцарева О. Д.

*Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина  
и Ю. А. Овчинникова Российской академии наук, Москва, Россия*

Разработка моделей *in vitro* для изучения клеточной биологии и физиологии клеток имеет большое значение в области биотехнологии, исследованиях рака и разработки противоопухолевых препаратов. Трехмерные многоклеточные сфероиды (3D культуры) представляют собой *in vitro* приближение к росту опухоли в организме. Однако культивируемые клеточные линии могут значительно отличаться между собой. Сравнение параметров роста различных линий клеток для изучения эффекта противоопухолевой терапии, а также физиологии опухолей позволит выбрать адекватную модель. В данной работе проведено сравнение параметров роста в 3D культурах панкреатических линий клеток. 3D культуры шести панкреатических клеточных линий ВхРС-3, ТЗМ4, Colo-357, ASPC-1, PANC-1 и MiaPaCa-2 получали на антиадгезивной пленке. При сравнении параметров роста показали, что клетки ВхРС-3 и ТЗМ4 в 3D условиях останавливались в росте, что было связано с высокой степенью апоптоза и некроза в этих клетках в 3D условиях.

*Ключевые слова:* многоклеточные опухолевые сфероиды, рак поджелудочной железы, пролиферация.



**Введение.** Разработка моделей *in vitro* для изучения клеточной биологии и физиологии клеток имеет большое значение в области биотехнологии, исследованиях рака и разработки противоопухолевых препаратов. Трехмерные многоклеточные сфероиды (3D культуры) представляют собой *in vitro* приближение к росту опухоли в организме [1]. Однако культивируемые клеточные линии могут значительно отличаться между собой. Сравнение параметров роста различных линий клеток для изучения эффекта противоопухолевой терапии, а также физиологии опухолей позволит выбрать адекватную модель. Рак поджелудочной железы является одним из наиболее тяжелых видов онкозаболеваний. Выживание в течение 5 лет после постановки диагноза составляет менее 10%. В данной работе проведено сравнение параметров роста в 3D культурах шести панкреатических линий клеток.

**Методы.** В работе использовали панкреатические клеточные линии ВхРС-3, ТЗМ4, Colo-357, ASPC-1, PANC-1 и MiaPaCa-2. Для получения 3D культур использовали антиадгезивную пленку PolyHEMA. Для получения адгезивных культур использовали обычный культуральный пластик. Для анализа роста клетки рассеивали в 6-ти луночные планшеты в 2D или 3D условиях. Клетки анализировали в динамике роста. Для анализа клеточности культуры обрабатывали трипсином и подсчитывали на камере Горяева. Анализ экспрессии E-кадгерина проводили методом конфокальной микроскопии с помощью антител к E-кадгерину (SantaCruz). Для этого клетки в 2D культурах выращивали на покровных стеклах и окрашивали прижизненно антителами к E-кадгерину, после чего клетки фиксировали 1% параформальдегидом и окрашивали вторыми антителами, меченными AlexaFluor594. Для анализа апоптоза и некроза в 3D культурах использовали йодистый пропидий. Окрашенные сфероиды анализировали методом конфокальной микроскопии.

**Результаты.** После внесения клеток на антиадгезивную пленку через 24 ч линии ВхРС-

3 и ТЗМ4 формировали плотные округлые сфероиды с выраженной границей. Клетки Colo-357 и ASPC-1 формировали мелкие кластеры нерегулярной формы без выраженной границы. Клетки линий MiaPaCa-2 и PANC-1 собирались в комки без видимого межклеточного контакта. Через 48 ч размер кластеров линий Colo-357 и ASPC-1 увеличивался. Анализ клеточности культур проводили через 24, 48, 72, 96 и 144 ч. Показали, что клетки линий ВхРС-3 и ТЗМ4, формирующие плотные крупные сфероиды, останавливались в росте в 3D культурах, остальные линии продолжали расти. В 2D культурах наблюдали сравнимый рост всех клеточных линий. Для понимания различий в скорости роста анализировали жизнеспособность клеток в 3D культурах с помощью окраски йодистым пропидием, который проникает в клетку при нарушении целостности клеток, то есть в апоптотические и некротические клетки, где связывается с ДНК клеток. Показали, что количество мертвых клеток было значительно выше в культурах ВхРС-3 и ТЗМ4 уже через 24 ч культивирования, чем в остальных, что объясняет остановку роста этих клеток.

Для понимания различия в форме сфероидов провели анализ экспрессии E-кадгерина, который формирует межклеточные контакты между эпителиальными клетками [2, 3]. Показали, что линии ВхРС-3, ТЗМ4, Colo-357 и ASPC-1 экспрессировали E-кадгерин на высоком уровне, тогда как PANC-1 и MiaPaCa-2 его почти не экспрессировали, что объясняет различия в формировании сфероидов, но не объясняет различия между плотными и рыхлыми сфероидами.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Achilli T.- M., Meyer J., Morgan J.R. Expert Opin Biol Ther 2012, 10, 1347-1360.
2. Iglesias J. M., Beloqui I., Garcia-Garcia F. et al. PLoS One 2013, 8 (10), e77281.
3. Kondo J., Endo H., Okuyama H., et al. Proc Natl Acad Sci USA 2011, 108 (15), 6235-6240.

## GROWTH OF PANCREATIC CELL LINES IN MULTICELLULAR 3D CULTURES

Myrsikova E. V., Kotsareva O. D.

*M. M. Shemyakin and Yu. A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, RAS, Moscow, Russia*

Development of *in vitro* cancer models is important for cell biology and physiology studies, biotechnology and cancer research, chemotherapeutic drug testing. Multicellular spheroids (3D cultures) closely reproduce the growth of cancer cells *in vivo*. However, cell lines can differ significantly in their ability to form 3D spheroids. A comparison of growth in 3D cultures of different cell lines can help to select appropriate models to study physiology and tumors and to test antitumor drugs. In this work we have compared the growth of pancreatic cell lines in 2D and 3D conditions. 3D cultures of six pancreatic lines BxPC-3, T3M4, Colo-357, ASPC-1, PANC-1 and MiaPaCa-2 were generated on anti-adhesive film. We demonstrated that in 3D conditions BxPC-3 and T3M4 cells completely stopped proliferation. The block in proliferation was associated with high level of apoptosis and necrosis in these cells.

## ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ТРАНСПЛАНТАТОВ СИНГЕННЫХ КЛЕТОК ФЕТАЛЬНОЙ ПЕЧЕНИ И МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК

Никольский И. С., Никольская В. В.

*ГУ Институт генетической и регенеративной медицины НАМН Украины,  
Киев, Украина*

Исследование влияния трансплантации сингенных клеток 13-дневной фетальной печени, мультипотентных стромальных клеток тимуса или фетальных кожно-мышечных нормальным мышам до или после иммунизации эритроцитами барана показало, что оба типа клеток могут влиять на гуморальный иммунный ответ и не изменяют реакцию гиперчувствительности замедленного типа. Действие на антителообразование определяется фазой иммунного ответа, тканевым происхождением МСК и контактным взаимодействием клеток.

*Ключевые слова:* иммунитет, гемопоэтические клетки фетальной печени, мультипотентные стромальные клетки.

Гемопоэтические стволовые клетки (ГСК) являются исходным элементом становления кроветворной и иммунной систем. Мультипотентные стромальные клетки (МСК) функционируют как бы разнонаправлено. С одной стороны, они представляют собой один из главных компонентов костномозговых и тимусных ниш ГСК и предшественников Т-лимфоцитов, поддерживающих кроветворение и формирование клеточного состава иммунной системы. С другой, по-видимому, вне ниш МСК обладают выраженным иммуносупрессивным действием в отношении характеризующих клеточный иммунитет реакций. *In vivo* супрессивная активность МСК проявляется в эффективной регуляции трансплантационного иммуните-

та. Однако, несмотря на приведенные данные, влияние трансплантированных в нормальный организм МСК и ГСК на иммунитет, в частности, гуморальный, и формирование реакций гиперчувствительности замедленного типа (РГЗТ) изучено недостаточно.

Исследования иммунобиологии МСК проводятся преимущественно с клетками костномозгового, жирового и пуповинно-плацентарного происхождения. При этом, как бы априори, принимается положение о том, что тканевое происхождение МСК не сказывается на их иммуноактивных функциональных свойствах. Разумеется, этот вопрос нуждается в освещении.

Показано, что МСК тимуса обладают противорадиационной активностью, но не ясно,

может ли этот эффект быть связанным с иммунобиологической активностью клеток [1].

Необходимо также отметить, что поддержка МСК жизнедеятельности ГСК и супрессия ими иммунитета создают условия для лучшего приживания трансплантированных ГСК. Установлено, что контактное взаимодействие МСК и ГСК усиливает иммунобиологическую, регенеративную и противорадиационную активность последних [2].

Нужно также учитывать, что не только МСК могут стимулировать ГСК, но и наоборот; контакт с гемопоэтическими клетками стимулирует линейную дифференцировку МСК [3].

Основываясь на изложенном, мы изучили влияние на антителогенез и РГЗТ введения нормальный мышам сингенных клеток фетальной печени 13-14 дней гестации (КФП), МСК тимуса (МСКт), кожно-мышечных фетальных МСК (МСКф), КФП, индуцированных контактом с МСКт или МСКф, а также МСКт и МСКф, индуцированных контактом с КФП.

Чтобы определить влияние клеток на продуктивную и индуктивную фазы иммунного ответа, внутривенное введение КФП ( $10^6$ ) и МСК ( $5 \times 10^4$ ) проводили за сутки до или сутки после иммунизации мышей эритроцитами барана (ЭБ). Через 4 дня делали разрешающую инъекцию ЭБ в подушечку задней лапы и через день исследовали РГЗТ и содержание гемагглютининов и гемолизинов в сыворотке, а также количество антителообразующих клеток в селезенке.

Установлено, что введенные КФП перед иммунизацией стимулировали антителогенез ( $\log_2$  титра гемагглютининов  $8,3 \pm 0,2$  против  $6,3 \pm 0,9$  у нормальных иммунизированных животных;  $p < 0,05$ ), а введенные после иммунизации эти клетки на синтез антител не влияли. А вот МСКт активировали антителогенез, будучи введенными и до, и после иммунизации (соответственно  $\log_2$  титра гемагглютининов  $8,2 \pm 0,6$  и  $6,4 \pm 0,6$  против  $4,9 \pm 0,5$  в контроле;  $p < 0,05$ ). На фоне устоявшихся представлений об иммуносупрессивном действии МСК это несколько неожиданный эффект. Хотя стимуляция формирования АОК при первичном иммунном ответе *in vitro* МСКт, но не МСК костного мозга или селезенки, показана [4]. Стимуляция гуморального ответа МСК может в определенной мере объяснить, почему введение летально облученным мышам МСКт, из которых не может быть регенерирована иммунная система, приводит к увеличению про-

должительности жизни [1]. Вполне вероятно, что, активируя антителогенез, МСК тормозят углубление инфекционного компонента костномозгового радиационного синдрома.

Индукция КФП МСКф приводила к стимуляции антителогенеза, а таковая МСКт отменяла стимулирующее действие индуцированных клеток, как и индукция КФП МСКт, что подтверждает наличие иммуноактивных различий в действии МСК разного происхождения и существование двустороннего процесса. Можно было также наблюдать, что МСКт и МСКф различались по влиянию на антителогенез: МСКф его не стимулировали.

Поскольку ни ГСК, ни МСК не влияли на формирование РГЗТ, можно предположить, что в исследованных условиях оба типа клеток заметно не действуют на дендритные клетки, развитие ТН1, макрофаги, в том числе, активированные, и их межклеточные взаимодействия.

Стимуляция антителообразования ГСК в индуктивную фазу и отсутствие такового в продуктивную позволяет думать об эффективном воздействии ГСК на распознавание антигена В-лимфоцитами, развитие ТН2 и взаимодействия в иммунном синапсе. МСК, действующие эффективно в обеих фазах, могут оказывать сходное влияние во время индукции иммунного ответа, а их активность в продуктивную фазу, возможно, обусловлена поддержкой функциональных свойств В-лимфоцитов [5], реализация которой МСК в отношении гемопоэтических клеток известна.

Полученные результаты свидетельствуют, что влияние трансплантаций ГСК и МСК на антителообразование у нормальных животных может определяться тканевым происхождением МСК, контактным взаимодействием клеток и фазой иммунного ответа.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Никольский И. С., Никольская В. В., Тарануха Л. И. и соавт. // Вестник Уральской медицинской академической науки. – 2009. – № 2/1 (24). – С. 284-285.
2. Никольский И. С., Никольская В. В., Зубов Д. А. и соавт. // Вестник Уральской медицинской академической науки. – 2010. – № 2/1 (29). – С. 61-62.
3. Jung Y., Song J., Shiozawa Y. et al. // Stem Cells. – 2008. – 26, № 8. – P.2042-2051.
4. Кулагина Н. Н., Сидоренко А. В., Фриденштейн А. Я. // Цитология. – 1978. – № 7. – С.808-814.
5. Фриденштейн А. Я., Лурия Е. А. М.: Медицина, 1980. – 216 с.

## IMMUNOBIOLOGICAL ACTIVITY OF SYNGENEIC FETAL LIVER CELLS AND MULTIPOTENT STROMAL CELLS TRANSPLANTS

Nikolsky I. S., Nikolskaya V. V.

*Institute of Genetic and Regenerative Medicine, Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kiev, Ukraine*

In this paper we investigated the effect of transplantation to normal mice of syngeneic cells 13-day fetal liver, thymic multipotent stromal cells or fetal musculocutaneous multipotent stromal cells before or after immunization with sheep red blood cells. It is shown that both types of cells may influence the humoral immune response and does not alter the delayed-type hypersensitivity reaction. Effect on antibody production is determined by the phase of the immune response, tissue origin of MSC and the contact cells interaction.

---

---

## МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ ПЕПТИДА ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА ПРОТЕГРИНА 1 НА МЕМБРАНЫ БАКТЕРИИ *E. COLI* ML35P

Орлов Д. С.<sup>1,2</sup>, Артамонов А. Ю.<sup>1</sup>, Жаркова М. С.<sup>1</sup>,  
Копейкин П. М.<sup>1</sup>, Орлов С. Б.<sup>3</sup>

*<sup>1</sup>ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург; <sup>2</sup>Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург; <sup>3</sup>Саратовский государственный медицинский университет, Саратов, Россия*

В работе исследованы молекулярно-клеточные механизмы антибактериального действия пептида системы врожденного иммунитета – протегрина-1. Полученные данные позволяют сделать вывод, что основным механизмом действия ПГ-1 на *E. coli* ML35p является нарушение барьерной функции мембран бактерий, формирование в них пор с диаметром около 2 нм, утечка из внутриклеточного пространства ионов калия, приводящие к осмотическому набуханию и разрушению бактериальных клеток.

*Ключевые слова:* врожденный иммунитет, антимикробные пептиды, протегрин-1.

Протегрин 1 (ПГ-1) – пептид системы врожденного иммунитета, имеющий широкий спектр антимикробного действия, а также обладающий и противоопухолевой активностью [1]. Однако экспериментальных данных о механизме действия этого пептида недостаточно.

Целью настоящей работы было выявление возможных клеточно-молекулярных механизмов антимикробного действия ПГ-1. Данные об эффектах ПГ-1 на искусственные мембраны [2] позволяют предположить образование пор в мембранах бактериальных клеток. Изучена кинетика изменения проницаемости мембран *E. coli* ML35p, имеющей β-лактамазу в периплазме и β-галактозидазу в цитоплазме, при отсутствии лактопермеазы. Были подобраны субстраты для данных ферментов, которые

дают флюоресцентные продукты реакции, что позволяет детектировать их появление. Интактные мембраны *E. coli* непроницаемы для субстратов, продукты реакции могут появиться в растворе только в случае повышения проницаемости мембран, вызванной, например, антимикробными пептидами. Можно судить о воздействии на внутреннюю и внешнюю мембраны избирательно. Субстратом β-лактамазы и маркером проницаемости внешней мембраны служил GeneBlazer (Invitrogen, USA), маркером проницаемости внутренней мембраны был DiFMUG (Invitrogen, USA) [3]. Суспензии бактерий ( $5 \times 10^6$  КОЕ/мл) в 10 мМ натрий-фосфатном буфере pH 7.4, содержащем 10 мкМ DiFMUG или GeneBlazer, инкубировали с ПГ-1, проводя с интервалом в 1 мин измерения при

длине волны возбуждающего флюоресценцию излучения – 380 нм, эмиссионного 460 нм. Проницаемость внешней мембраны *E.coli* резко возрастала при внесении в среду ПГ-1 (5мкг/мл), о чем свидетельствовал рост флюоресценции вследствие появления во внеклеточной среде продукта гидролиза GeneBlazer. Рост проницаемости наблюдался, начиная с 8 минуты после внесения пептида, и достигал максимума к 15 минуте эксперимента, в отличие от контроля. Проницаемость внутренней мембраны детектировалась с 6-7 минуты после внесения пептида в инкубационную среду, максимума флюоресценция достигала к 30 минуте. В контроле роста проницаемости не наблюдалось. Маркер проницаемости внутренней мембраны DiFMUG (с молекулярной массой 374.29) начинал проникать в клетку раньше, чем маркер для внешней мембраны (с молекулярной массой 856.23), возможно из-за роста диаметра пор в мембранах. Рост проницаемости мембран ведет к утечке в внеклеточное пространство ионов калия. Утечка калия снижает осмолярность внутри клеток, препятствуя входу молекул воды, способной привести к осмотическому разрушению клеток [4]. Электрохимическое определение выхода калия [5], показало, что с 2 минуты от внесения ПГ-1 (25мкг/мл) до 5 минуты эксперимента клетки теряли 85% общего содержания калия. В тоже время, методом подсчета колоний показано практически полное отсутствие в суспензии живых бактерий к этому моменту времени. Воздействие меньших концентраций ПГ-1 отличалось только процентом выхода калия: 2.5 мкг/мл ПГ-1–60%, 10 мкг/мл – 80% общего количества внутриклеточного калия выходило из клеток. В контроле содержание калия в суспензии не менялось и его выхода из клеток не наблюдалось. Данные подтверждают предположение о том, что в основе антимикробного действия протегрина-1 на клетки *E.coli* лежит повышение проницаемости бактериальных мембран. Кроме того, потеря калия может рассматриваться как обязательная стадия в механизме антимикробного действия ПГ-1. Если пептид вызывает формирование пор в мембранах бактерий, а внутренняя среда обладает высокой осмолярностью (до 300 мОсм) [4], то со временем это должно приводить к набуханию клеток, входу в них воды и осмотическому разрушению. Увеличение размеров клеток может быть детектировано по изменению оптической

плотности суспензии клеток. Условия экспериментов, проведенных нами, были те же, что и в опытах по изучению проницаемости клеток с помощью флюоресцентных маркеров. Отличие состояло лишь в том, что регистрировалась оптическая плотность при длине волны 420 нм. Установлено, что внесение в суспензию клеток *E.coli* пептида в концентрации 25 мкг/мл приводило к росту оптической плотности (от 0.02 до 0.08), что свидетельствует о набухании клеток. Набухание развивалось через 3 мин после внесения ПГ-1, к 5 мин рост оптической плотности достигал плато. В контроле, в отсутствие пептида, рост оптической плотности не наблюдался. Полученные данные могут рассматриваться как подтверждение предположения о порообразовании как основном механизме антимикробного действия ПГ-1.

Оценка размеров формируемых этим антимикробным пептидом пор была произведена путем внесения в суспензию бактерий полиэтиленгликолей (ПЭГ 200, 300, 400, 600, 1000, 2000; 0.3M; Sigma, USA) – нейтральных молекул с различной молекулярной массой и гидродинамическим радиусом. В присутствии во внеклеточной среде ПЭГ с гидродинамическим радиусом, превосходящим диаметр предполагаемых пор, набухания и нарушения барьерной функции мембран не наблюдалось. Ранее подобный экспериментальный подход был описан в литературе для экспериментов с искусственными мембранами. Нами показано что при обработке бактерий протегрином-1 (25 мкг/мл) рост оптической плотности, свидетельствующий о набухании клеток, не наблюдался в присутствии ПЭГ с массой от 1000 Да. Учитывая гидродинамический радиус полиэтиленгликоля ПЭГ1000, диаметр протегриновых пор может быть рассчитан и составил 2 нм. Аналогичные данные были получены и в экспериментах по изучению влияния ПГ-1 на проницаемость мембран *E.coli*: в присутствии ПЭГ с массой более 1000 Да подавляется индуцированный ПГ-1 рост проницаемости мембран. Эти результаты согласуются с данными зарубежных исследователей для искусственных мембран, моделирующих мембраны клеток *E.coli* [2].

Полученные данные позволяют сделать вывод, что основным механизмом действия ПГ-1 на *E.coli* ML35r является нарушение барьерной функции мембран бактерии, формирование в них пор с диаметром около 2 нм, повышение проницаемости бактериальных мембран,

утечку из внутриклеточного пространства ионов калия, что приводит к дальнейшему осмотическому набуханию и разрушению клеток.

Работа поддержана грантом РФФИ № 13-04-02102а и Программой «Протеом человека».

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Шамова О.В., Сакута Г.А., Орлов Д.С. и др. // Цитология. – 2007, – Том 49, № 12. – С. 1000-1010.
2. D. Gidalevitz, Y. Ishitsuka, A. Muresan et al. // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2003. – Vol. 100, N 11. – P. 6302-6307.
3. Артамонов А. Ю., Шамова О. В., Кокряков В. Н., Орлов Д. С. // Вестник СПбГУ. – 2008. – Сер. 3: биология. – Вып. 2. – С.139-142.
4. Neidhardt, F.C. et al. (eds) Cellular and Molecular Biology. Vol 1, 2. – 2nd edn. American Society for Microbiology. – 1996. – Washington, DC
5. Orlov D., T. Nguen, R. Lehrer // J. of Microbiol. Methods. – 2002. – Vol.49. – P. 325-328

### MOLECULAR MECHANISMS OF ACTION OF A PEPTIDE OF THE INNATE IMMUNE SYSTEM PROTEGRIN-1 ON *E. COLI* ML35P MEMBRANES

Orlov D.S.<sup>1,2</sup>, Artamonov A. Yu.<sup>1</sup>, Zharkova M. C.<sup>1</sup>,  
Kopeykin P. M.<sup>1</sup>, Orlov S. B.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg; <sup>2</sup>Saint Petersburg State University, Saint Petersburg; <sup>3</sup>Saratov State Medical University, Saratov, Russia

This work is devoted to elucidation of molecular mechanisms of the antibacterial action of protegrin 1 – a peptide of the innate immune system. The obtained data allow concluding that the pivotal mechanism of action of protegrin-1 on *E.coli* ML35p consists in an impairment of a barrier function of bacterial membranes, formation of pores with a diameter of 2 nm, release of intracellular potassium leading to osmotic swelling and destruction of bacterial cells.

*Key words:* innate immunity, antimicrobial peptides, protegrin-1.

### ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА Fc ФРАГМЕНТОВ IgG КРЫС, НЕСУЩИХ ДЕТЕРМИНАНТЫ ДЛЯ АНТИТЕЛ, ПОДАВЛЯЮЩИХ АУТОИММУННЫЕ РЕАКЦИИ

Сидоров А. Ю., Терентьев А. С.

ФГБОУ ВПО «Удмуртский Государственный Университет», Ижевск, Россия

В ранее проведенных исследованиях мы обнаружили, что ключевым фактором регуляции аутоиммунных реакций, предотвращающим развитие аутоиммунных заболеваний, являются лимфоциты, продуцирующие ревматоидный фактор (РФ). Также было показано, что антигенные детерминанты, стимулирующие РФ-продуцирующие лимфоциты, можно индуцировать на Fc-фрагментах гомологичного IgG. Однако образующиеся в результате папаинового протеолиза Fc-фрагменты разнообразны по физико-химическим свойствам, что предполагает неоднородность антигенных свойств и биологической активности препарата Fc фрагментов. Целью работы являлась разработка методов разделения Fc-фрагментов IgG и выяснение физико-химических свойств Fc фрагментов IgG, несущих антигенные детерминанты для ревматоидного фактора. Обнаружено, что Fc фрагменты IgG крысы, несущие детерминанты для ревматоидного фактора, подавляющего аутоиммунные реакции, имеют электрофоретическую подвижность отличную от подвижности фрагментов, не несущих детерминанты для РФ и могут быть очищены от нецелевых Fc фрагментов методом анионообменной хроматографии на DEAE-сефарозе.

*Ключевые слова:* Fc-фрагменты IgG крыс, ревматоидный фактор, анионообменная хроматография.

**Актуальность и цель работы.** В ранее проведенных исследованиях мы обнаружили, что ключевым фактором регуляции аутоиммунных реакций, предотвращающим развитие аутоиммунных заболеваний, являются лимфоциты, продуцирующие ревматоидный фактор (РФ) [1]. На модели экспериментального артрита показано, что стимуляция лимфоцитов, продуцирующих ревматоидный фактор, ведет к подавлению аутоиммунных реакций и редукции симптомов заболевания [2]. Поэтому лимфоциты, продуцирующие РФ, могут рассматриваться как биомишень, воздействуя на которую можно подавлять активность аутоиммунных реакций. Также нами было показано, что Fc-фрагменты гомологичного IgG, полученные методом папаинового протеолиза, могут нести антигенные детерминанты для РФ-продуцирующих лимфоцитов [2] а, следовательно, Fc-фрагменты могут быть использованы для создания нового лекарственного средства от аутоиммунных заболеваний, направленного на восстановление механизмов аутореактивности. Однако образующиеся в результате папаинового протеолиза Fc-фрагменты разнообразны по физико-химическим свойствам, что предполагает неоднородность антигенных свойств и биологической активности препарата Fc фрагментов. Поэтому целью работы являлась разработка методов разделения Fc-фрагментов IgG и выяснение физико-химических свойств Fc фрагментов IgG, несущих антигенные детерминанты для ревматоидного фактора.

**Материалы и методы.** Объектом исследования были Fc фрагменты IgG крысы. Наличие антигенных детерминант для ревматоидного фактора на Fc фрагментах IgG крыс определяли по способности Fc фрагментов вызывать продукцию ревматоидного фактора у интактных крыс. Популяцию РФ, подавляющего аутоиммунные реакции, определяли методом агглютинации танализованных нагруженных гомологичным IgG эритроцитов. Иммуноглобулин G получали из сульфатного осадка глобулиновой фракции сыворотки крыс следующими способами: аффинная хроматография на протеин G-сефарозе. Фрагменты получали методом папаинового протеолиза по следующим схемам: последовательное расщепление папаином и восстанавливающим агентом (метод Утсуми); расщепление папаином, с предварительной обработкой восстанавливающим агентом без его удаления;

расщепление иммобилизованным папаином из набора для получения фрагментов Pierce по прилагающейся к набору методике с использованием буферных систем из набора. Fc фрагменты IgG крысы очищали от цельного IgG методом эксклюзионной хроматографии на колонке 24/400 с сорбентом Sephacryl S-100, от Fab-фрагментов аффинной хроматографией на протеин G – сефарозе [3]. Fc фрагменты IgG исследовали методом ДСН-электрофореза в ПААГ в диссоциирующих условиях.

**Результаты.** Обнаружено, что катионообменная хроматография на KM-сефарозе не позволяет разделять Fc-фрагменты IgG крыс на отдельные фракции. Методом анионообменной хроматографии на DEAE-сефарозе Fc-фрагменты IgG крыс можно разделить на три фракции. Первая фракция не связывается с DEAE-сефарозой, при нанесении в 0,015 М натрий-фосфатном буфере pH 7,5, вторая элюируется градиентом хлорида натрия в натрий-фосфатном буфере в диапазоне проводимости раствора 2,8–15 mS, третья элюируется в диапазоне проводимости 15–25 mS. В ответ на иммунизацию крыс фракциями Fc фрагментов IgG, а также гомологичным нативным IgG, продукция ревматоидного фактора наблюдалась только в случае иммунизации фракцией, элюируемой градиентом хлоридом натрия в диапазоне проводимости раствора 2,8–15 mS.

Физико-химические свойства Fc фрагментов IgG крысы, полученных с использованием разных схем протеолиза, не отличаются. Схемы протеолиза также не влияют на способность получаемых Fc фрагментов вызвать продукцию ревматоидного фактора *in vivo*.

Однако мы заметили, что электрофоретическая подвижность Fc фрагментов IgG крыс, полученным одним и тем же способом, но из разных партий иммуноглобулина G, отличается. Изменение электрофоретической подвижности ассоциировано с потерей способности Fc фрагментов IgG вызывать продукцию ревматоидного фактора у крыс. Необходимо выяснить, какими свойствами должен обладать препарат иммуноглобулина G крысы для получения Fc фрагментов, несущих антигенные детерминанты для ревматоидного фактора. Таким образом, выяснены физико-химические свойства Fc фрагментов IgG, несущих антигенные детерминанты для ревматоидного фактора, подавляющего аутоиммунные реакции, разработан метод их выделения. Fc фрагменты IgG крысы, несущие

щие детерминанты для ревматоидного фактора, подавляющего аутоиммунные реакции, имеют электрофоретическую подвижность отличную от подвижности фрагментов, не несущих детерминанты для РФ, обладают сродством к DEAE-сефарозе и могут быть очищены от нецелевых Fc фрагментов методом анионообменной хроматографии на DEAE-сефарозе.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Beduleva L., Menshikov I., Stolyarova E., Fomina K., Lobanova O. et al. International Journal of Rheumatic Diseases 2014, doi. 10.1111/1756-185X.12335.
- 2, Меньшиков И. В., Бедулева Л. В. Патент на изобретение № 2385164, 2010.
- 3, Терентьев А. С. Вестник УдГУ. Биология. Наука о земле 2012, 4, 91-95.

## PHYSICAL AND CHEMICAL PROPERTIES OF FC-FRAGMENTS OF RAT IGG CARRYING THE ANTIGENIC DETERMINANTS FOR RHEUMATOID FACTOR TO SUPPRESS THE AUTOIMMUNE REACTION

Sidorov A. Yu., Terentiev A. S.

*FSEI HPE «Udmurt State University», Izhevsk, Russia*

Previously, we have discovered that the main factor of regulation the autoimmune reactions and suppression of autoimmune diseases is lymphocytes producing the rheumatoid factor (RF). Also, we showed that antigenic determinants for lymphocytes producing the rheumatoid factor can be induced on Fc-fragments of homologous IgG. However, Fc-fragments obtained by papain proteolysis differ in physical and chemical characteristics and this suggests the difference it antigenic properties and biological activity. The aim of our research is to develop methods of IgG Fc-fragments' separation and study physical and chemical properties of Fc-fragments that carry antigenic determinants for lymphocytes producing the rheumatoid factor. It was found that the Fc-fragments of rat IgG that carry antigenic determinants for rheumatoid factor differ in electrophoretic mobility as compared with the fragments that do not carry the antigenic determinants for rheumatoid factor and can be cleared of the unnecessary Fc-fragments using the method of anion exchange chromatography on DEAE-sepharose.

## ПОИСК ДЕСКРИПТОРОВ В РЯДУ КАРБОНИЛЬНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ТИОФЕНА

Шкляев Ю. В.

*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт технической химии Уральского отделения Российской академии наук, Пермь, Россия*

Показано, что ПМА тиосемикарбазонов ряда эфиров тиенил-2-глиоксиловой кислоты линейно зависит от их липофильности. Корреляции между дипольным моментом соединений и проявляемой ими ПМА не установлено.

*Ключевые слова:* замещенные тиофены, противомикробная активность.

Являясь наиболее  $\pi$ -избыточным гетероциклом среди пятичленных гетероциклов с одним гетероатомом, тиофен нашел широкое применение в качестве удобного объекта для получения разнообразных органических материалов с нелинейными оптическими свойствами [1,2], построения макроциклических

соединений [3] и т.п. В то же время работ, посвященных поиску новых противомикробных препаратов, практически нет – можно упомянуть только весьма старую монографию Липкина и Бучина [4].

Представляло интерес изучить поведение карбонильных соединений замещенных тио-



фенов и полученных из них гидразонов по отношению к грамположительным (*St. aureus 209-P*) и грамотрицательным (*E. coli 675*) микробам, а также найти факторы, которые влияют на проявляемую активность.

Для выяснения влияния характера и роли заместителей в тиофеновом ядре нами были синтезированы этиловые эфиры тиенил-2-глиоксиловых кислот как для незамещенного в ядре тиофена, так и содержащего арильные, арил-метильные, диарильные и 5-фенил-4-(4'-фторфенил) – заместители.

Полученные карбонильные производные тиофенового ряда были испытаны на активность против кишечной палочки и золотистого стафилококка. Как было установлено, все соединения проявляют низкую антимикробную активность, однако отмечено возрастание активности от 1000 мкг/мл до 62.5 мкг/мл при переходе от этилового эфира тиенил-2-глиоксиловой кислоты к этиловому эфиру 4,5-дифенилтиенил-2-глиоксиловой кислоты [5].

Как отмечено в [4], активность самих карбонильных производных тиофена сравнительно невелика, однако она возрастает при появлении в молекуле азометиновой связи. Исходя из этого были получены тиосемикарбазоны (TSC) ряда этоксиглиоксилзамещенных тиофенов и испытана их активность против *E. coli 675* и *St. aureus 209-P*, причем TSC производных тиофенглиоксиловых кислот оказались вполне активными против *E. coli 675* и *St. aureus 209-P*. Так, наименьшая бактерицидная активность для TSC этилового эфира тиофен-2-глиоксиловой кислоты (1) составила 250 мкг/мл и 125 мкг/мл, TSC этилового эфира 5-фенилтиенил-2-глиок-

сильной кислоты (2) – 125 мкг/мл и 62.5 мкг/мл, аналогичных производных 3-метил-5-фенилтиофена (3) – 62.5 мкг/мл, 4,5-дифенилтиофена (4) – 12.5 и 6.25 мкг/мл, соответственно. Несколько неожиданно активность производного 4-метил-2,3-дифенилтиофена (5) резко снизилась против *E. coli 675* – до 100 мкг/мл и столь же резко повысилась для *St. aureus 209-P* – до 0.78 мкг/мл.

С помощью программ ChemBioDraw Ultra 11.0 и HyperChem 8.0, были рассчитаны липофильность и дипольный момент исследованных соединений.

ПМА производных тиофена хорошо коррелирует с липофильностью соединений для *St. aureus 209-P* (коэффициент корреляции 0.9661), и несколько хуже – для ПМА *E. coli 675* (коэффициент корреляции 0.682), в то время как данные по дипольным моментам соединений 1-5 статистической обработке не поддаются.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Игнатенко Е. А., Шкляева Е. В., Абашев Г. Г. // ЖОРХ, 2013, т. 49, вып. 9, с. 1394-1400.
2. Т. С. Ельшина, Е. А. Соснин, Е. В. Шкляева, Г. Г. Абашев // Журнал общей химии, 2013, 83, 4, 644-648.
3. Новые направления химии тиофена, под ред. Гольдфарба Я. Л., М.: Наука, 1976.
4. П. И. Бучин, А. Е. Липкин // Производные тиофена и битиофена как перспективные антисептики новой группы – Саратов, Изд. Саратовского госуниверситета, 1974, 104 с.
5. Шкляев Ю. В., Дормидонтов Ю. П., Лапкин И. И., Прохорова Т. С. // в сб. Получение биологически активных продуктов органического синтеза, Свердловск: Изд-во УрО АН СССР, 1988, с. 56.

## INVESTIGATION OF DESCRIPTORS IN THE CARBONYL DERIVATIVES OF THIOPHEN SEQUENCE

Shklyayev Yu. V.

Federal State Budgetary Institution of Technical Chemistry, Ural Branch of Russian Academy of Science, Perm, Russia

It is shown that antimicrobial activity (AMA) of thiosemicarbazone ethers of thieny-2-glyoxylic acid sequence depends on their lypophilicity. Correlation between the dipole moment and the shown AMA was not detected.

## КРЕМНИЙЦИНКСОДЕРЖАЩИЙ ГЛИЦЕРОГИДРОГЕЛЬ – ПОТЕНЦИАЛЬНЫЙ ИММУНОТРОПНЫЙ ПРЕПАРАТ ТОПИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ

Штанько И. Н.<sup>1</sup>, Ваневская Е. А.<sup>2</sup>, Мандра Ю. В.<sup>2</sup>,  
Хонина Т. Г.<sup>1</sup>, Тузанкина И. А.<sup>3,4</sup>, Чупахин О. Н.<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>Институт органического синтеза им. И. Я. Постовского УрО РАН; <sup>2</sup>Уральский государственный медицинский университет Минздрава России; <sup>3</sup>Институт иммунологии и физиологии УрО РАН; <sup>4</sup>Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б. Н. Ельцина, Екатеринбург, Россия

Изучено влияние кремнийцинксодержащего глицерогидрогеля на репарацию поврежденных участков кожи крыс на фоне иммуносупрессии, а также на процесс заживления патологических элементов у пациентов с простым герпесом губ. Полученные результаты показывают, что кремнийцинксодержащий глицерогидрогель можно рассматривать в качестве потенциального иммунотропного препарата топического применения с антибактериальной, противовирусной и ранозаживляющей активностью.

**Ключевые слова:** кремнийцинксодержащий глицерогидрогель, иммунотропное действие, герпес, топическое применение.

Разработка новых лекарственных средств для местного лечения заболеваний кожи, мягких тканей и слизистой оболочки различной этиологии с использованием иммунотропных веществ приобретает особую актуальность, которая обусловлена резистентностью микроорганизмов к антибактериальным средствам, изменениями иммунных функций у населения из-за роста нарушений нейро-иммуно-эндокринных взаимодействий, наличием маскирующих форм иммунопатологий, обуславливающих прогрессирование патологии и терапевтическую толерантность. При этом отмечается, что местное использование иммунотропных средств в ряде случаев является более эффективным, чем системное введение, когда возможны выраженные побочные эффекты.

Учитывая актуальность использования иммунотропных средств, в том числе, и для местного применения, нами синтезирован новый фармакологически активный кремнийцинксодержащий глицерогидрогель на основе тетраглицеролата кремния  $\text{Si}[\text{OCH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{OH}]_4$  и моноглицеролата цинка  $\text{Zn}[\text{OCH}_2\text{CH}(\text{CH}_2\text{OH})\text{O}]$  [1, 2]. Известно, что моноглицеролат цинка обладает разнообразной фармакологической активностью: антибактериальной, противовирусной и дерматопротек-

торной. При этом эссенциальный микроэлемент цинк в организме человека принимает участие во многих ферментативных реакциях, повышает устойчивость к инфекционным заболеваниям, принимает непосредственное участие в формировании Т- и В-клеточного иммунитета. Дефицит микроэлемента цинка в организме человека приводит к нарушению функционирования клеток иммунной системы – иммунных функций. Эссенциальный микроэлемент кремний в биологически активной форме (в форме глицеролатов) оказывает выраженное репаративное и регенерирующее действие на все виды тканей организма [3].

Нами было показано, что синтезированный кремнийцинксодержащий глицерогидрогель нетоксичен, проявляет умеренную антибактериальную активность (*in vitro*), оказывает выраженное ранозаживляющее и регенерирующее действие [1, 2].

Целью данной работы являлась оценка иммунотропного действия кремнийцинксодержащего глицерогидрогеля.

**Методы исследования.** Оценка эффективности кремнийцинксодержащего глицерогидрогеля в обеспечении иммунозависимых функций проводили на модели осложненного раневого процесса у крыс (механическая трав-

ма нижней части спины) популяции Wistar на фоне иммуносупрессии, вызванной введением гидрокортизона по методике, описанной в статье [4]. Животные были разделены на 3 группы по 15 особей в каждой: крысам 1-й группы гидрокортизон не вводили, крысам 2-й и 3-й групп в течение всего эксперимента ежедневно внутримышечно вводили гидрокортизон в дозе 40 мг/кг. Крысам 3-й группы на место ранения наносили кремнийцинк-содержащий глицерогидрогель; животные 1-й и 2-й групп лечения не получали.

В ходе эксперимента фиксировали сроки ранозаживления, а также проводили гистологическое и иммуногистохимическое исследование участков кожи крыс после заживления ран. В иммуногистохимическом исследовании оценивали клетки с маркерами CD68.

После завершения доклинических исследований на экспериментальных животных, а также стандартизации кремнийцинк-содержащего глицерогидрогеля [5] нами было проведено клиническое исследование на ограниченном числе пациентов-добровольцев с простым герпесом губ (В00.11, МКБ-10) в Стоматологической поликлинике Уральского государственного медицинского университета. Для этого были отобраны 2 группы пациентов: исследуемая и контрольная, при этом всем пациентам было проведено комплексное обследование и назначено лечение. В исследуемой группе в комплексной терапии простого герпеса губ в качестве местного лекарственного средства был назначен кремнийцинк-содержащий глицерогидрогель. В контрольной группе проводили только системное лечение, местные средства не использовали. Эффективность лечения оценивали путем определения сроков эпителизации патологических элементов на красной кайме губ; также проводили оценку динамики изменения общих и иммунологических показателей ротовой жидкости.

**Основные результаты.** При изучении влияния кремнийцинк-содержащего глицерогидрогеля на репарацию поврежденных участков кожи крыс на фоне иммуносупрессии было установлено, что на 14-й день эксперимента полная эпителизация ран в 100% случаев наблюдалась в 1-й группе (без лечения) и 3-й группе (лечение кремнийцинк-содержащим глицерогидрогелем). У крыс 2-й группы к указанному сроку полной эпителизации не наблюдалось.

При гистологическом исследовании образцов кожи, полученных в ходе лечения, наиболее выраженная положительная динамика с улучшенными морфоструктурными показателями наблюдалась для кремнийцинк-содержащего глицерогидрогеля.

В иммуногистохимическом исследовании было показано, что для образцов травмированной кожи, обработанных кремнийцинк-содержащим глицерогидрогелем, значимо определяются макрофаги (CD68<sup>+</sup>), что подтверждает положительный эффект, обеспеченный топическим воздействием исследуемого геля на механизмы иммунитета.

Результаты клинического исследования показали, что сроки эпителизации патологических элементов в исследуемой группе пациентов составили 4–5 суток, в контрольной группе ~ 7 суток. Анализ общих и иммунологических показателей ротовой жидкости показал более быструю их нормализацию в исследуемой группе, что свидетельствует, вероятнее всего, о противовирусном и иммуностропном действии кремнийцинк-содержащего глицерогидрогеля.

Полученные результаты показывают, что кремнийцинк-содержащий глицерогидрогель можно рассматривать в качестве потенциального иммуностропного препарата топического применения с антибактериальной, противовирусной и ранозаживляющей активностью, что представляет интерес для дальнейшего более углубленного изучения с целью возможного внедрения в медицинскую практику.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 15–03–01770) и Президиума УрО РАН.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Пат. РФ № 2520969, 2014. Бюл. № 18.
2. Чупахин О.Н., Бондарев А.Н., Штанько И.Н. и др. // Известия Академии наук. Серия химическая. – 2014. – № 5. – С. 1219–1224.
3. Бояковская Т.Г., Хонина Т.Г., Ларионов Л.П. и др. // Новые материалы для медицины: кол. монография / НИСО УрО РАН. – Екатеринбург, 2006. – С. 108–134.
4. Gupta A., Jain G.K., Raghbir R. // Journal of Pharmacological and Toxicological Methods. – 1999. – V. 41. – P. 183–187.
5. Штанько И.Н., Бондарев А.Н., Хонина Т.Г., Москаленко Н.И. // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2014. – № 11. – С. 27–31.

## SILICONE-ZINC-CONTAINING GLYCEROHYDROGEL AS POTENTIAL IMMUNOTROPIC DRUG FOR TOPICAL APPLICATION

Shtan'ko I. N.<sup>1</sup>, Vanevskaya E. A.<sup>2</sup>, Mandra J. V.<sup>2</sup>, Khonina T. G.<sup>1</sup>,  
Tuzankina I. A.<sup>3,4</sup>, Chupakhin O. N.<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>Postovsky Institute of Organic Synthesis of Ural Branch of RAS; <sup>2</sup>Ural State Medical University; <sup>3</sup>Institute of Immunology and Physiology of Ural Branch of RAS; <sup>4</sup>Ural Federal University, Ekaterinburg, Russia

The influence of silicone-zinc-containing glycerohydrogel on the reparation of rats damaged skin on the background of immunosuppression, as well as on the healing process of the pathological elements in patients with the Herpes simplex of lips were studied. The results obtained have shown that silicone-zinc-containing glycerohydrogel could be considered as a potential immunotropic drug for topical application with antibacterial, antiviral and wound-healing activities.

*Keywords:* silicone-zinc-containing glycerohydrogel, immunotropic activity, Herpes simplex, topical application.

---

## ЭФФЕКТ ВКЛЮЧЕНИЯ ПРОИЗВОДНЫХ ХИТОЗАНА НА ИММУНОГЕННЫЕ СВОЙСТВА БЕЛКОВЫХ НАНОЧАСТИЦ

Щербинина Т. С.<sup>1</sup>, Зубарева А. А.<sup>1</sup>, Варламов В. П.<sup>1</sup>,  
Свирцевская Е. В.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ФГБУН Центр «Биоинженерия» РАН; <sup>2</sup>ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

В настоящее время нет эффективных противовирусных вакцин, что связано с трудностью индукции цитотоксического ответа на синтетические антигены. В данной работе изучали влияние включения в наночастицы лактоферрина (НЛ) производных хитозана на индукцию гуморального и цитотоксического клеточного ответа. Получили три типа частиц: НЛ, НЛ с включением сукциноилхитозана (НЛС) и дополнительно покрытые хитозаном (НЛСХ). НЛ и НЛС получали методом контролируемой термической обработки. Полученные НЛС дополнительно покрывали низкомолекулярным хитозаном за счет образования полиэлектролитного комплекса. Мышей BALB/c иммунизировали в/б суспензией наночастиц без дополнительных адъювантов. Антиген-специфическую продукцию IgG и клеточный иммунный ответ оценивали после 3-кратной иммунизации. Показали, что во всех группах формировался сравнимый гуморальный ответ. Пролиферация Т-клеток была достоверно выше в группах, иммунизированных хитозан-содержащими НЛ. Различий в доле CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток между группами не было. Таким образом, введение хитозана в состав вакцины приводит к усилению клеточного ответа при сохранении гуморального.

*Ключевые слова:* хитозан, лактоферрин, вакцины, гуморальный иммунный ответ, клеточный иммунный ответ.

**Актуальность и цель работы.** Для предотвращения вирусных инфекций требуется активация цитотоксических Т-лимфоцитов, что обеспечивается процессингом антигена через цитозольный путь. Наиболее эффективную

защиту обеспечивают вакцины на основе ослабленных штаммов вирусов, способных проникать в цитозоль клеток. Однако у людей с ослабленным иммунитетом аттенуированные вакцины могут вызывать разви-

тие заболевания. В связи с этим в настоящее время разрабатываются более безопасные субъединичные вакцины. Такие вакцины непатогенны, не вызывают побочных реакций на введение вакцины и легко стандартизируются. Недостатком субъединичных вакцин является их низкая эффективность, так как при их использовании защитный эффект обусловлен стимуляцией выработки антител при отсутствии цитотоксического клеточного ответа, который необходим для защиты от вирусных инфекций. Поэтому в настоящее время внимание исследователей сосредоточено на создании композиций, способных индуцировать клеточный ответ, основанный на активации CD8<sup>+</sup> Т-клеток. В качестве носителя антигена для создания таких композиций широко применяются липосомы, наночастицы на основе PGA, PLGA, PLA, а также частицы на основе хитозана и его производных [1]. В данной работе исследуется зависимость гуморального и клеточного иммунного ответа на наночастицы на основе лактоферрина и производных хитозана с разным зарядом. Ранее нами показано, что положительно заряженные производные хитозана попадают в цитоплазму клеток минуя эндосомы и лизосомы [2].

**Материалы и методы.** Лактоферрин (ЛФ) был выделен из сыворотки коровьего молока методом ионообменной хроматографии. Хитозан с молекулярной массой (ММ) 20 кДа и 50 кДа и степенью дезацетилирования (СД) 90% получали методом кислотного гидролиза высокомолекулярного хитозана (ММ=1000 кДа, СД=87%). Наночастицы ЛФ-НЛ получали методом контролируемой термической обработки [3] при температуре 80-85°C. Для получения НЛС использовали сукциноилхитозан (С) (полученный из хитозана с ММ=50 кДа) со степенью замещения 70%. Частицы НЛС получены в массовом соотношении Л/С=1/1 с добавлением 20% ПЭГ 2000. Частицы НЛСХ получали из НЛС ресуспендированием в растворе хитозана с ММ = 20 кДа. Полученные частицы промывали фосфатным буфером и отделяли центрифугированием. Размер наночастиц и заряд определяли с помощью метода динамического светорассеяния (Brookhaven, США). Для анализа морфологии наночастиц использовали метод атомно-силовой микроскопии (NTEGRA-Prima, Россия) в полуконтактном режиме.

Мышей BALB/с трехкратно иммунизировали в/б 100 мкл суспензии наночастиц, содер-

жащей 25 мкг белка. Повторные иммунизации проводили через 4 сут. На третьи сутки после последней иммунизации получали сыворотки крови из ретроорбитального синуса и анализировали продукцию IgG методом ИФА. На двадцатые сутки после первой иммунизации мышей забивали и выделяли селезенки для анализа.

Клеточный ответ оценивали по пролиферации спленоцитов в ответ на 20, 40 и 80 мкг/мл Л. Долю пролиферирующих бластных форм, а также количество CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток оценивали с помощью проточной цитометрии на приборе FACScan (BD, США) на 3 и 5 сут, для чего клетки окрашивали конъюгированными с красителем антителами против TCR, CD4 и CD8, мертвые клетки исключали окрашиванием йодистым пропидием. Анализ пролиферации также оценивали на 3 и 5 сут инкубации клеток с использованием реактива CellTiter-Blue (Promega) и МТТ.

**Результаты и обсуждение.** Для формирования частиц было подобрано массовое соотношение ЛФ: СХ=1:1, при котором частицы были наиболее стабильны и содержали около 50% белка. Введение ПЭГ в смесь полимеров способствовало повышению выхода частиц и позволило снизить температуру формирования частиц с 90 °С до 80 °С. Частицы НЛ, НЛС и НЛСХ имели размер 110, 200 и 300 нм и ζ-потенциал 23, -15 и 19 мВ соответственно.

При исследовании уровня антител IgG, специфичных к Л, было показано, что все исследованные типы частиц стимулировали сравнимый уровень синтеза антител. Таким образом, добавление хитозана в частицы не влияло на выработку гуморального ответа.

Для исследования активации первичные культуры спленоцитов стимулировали различными дозами антигена, после чего определяли пролиферацию клеток в зависимости от дозы антигена. Максимум пролиферации достигался при концентрации Л 40 мкг/мл как на 3, так и на 5 сут культивирования. На третьи сутки инкубации индексы пролиферации, при исследовании методом проточной цитометрии, в ряду контроль-НЛ-НЛС-НЛСХ составили 1,6-1,7-2,1-2,1 соответственно.

Анализ количества активированных (бластных) CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток показал их достоверное увеличение в группах, иммунизированных НЛС и НЛСХ, по сравнению с группой НЛ и контролем. Различий между

группами, иммунизированными конструкциями с разным зарядом, не выявили. Таким образом, включение полисахаридов в состав белковых наночастиц модифицирует иммунный ответ и вызывает усиление пролиферации как в популяции CD4<sup>+</sup>, так и CD8<sup>+</sup>-лимфоцитов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. De Temmerman M.- L. et al. Drug discovery today 2011, 16 (13–14), 569-582.
2. Zubareva A. et al. Nanoscale 2015, doi 10.1039/C5NR00327J.
3. Bengoechea C., Peinado I., McClements D.J. Food Hydrocolloids 2011, 25 (5), 1354-1360.

## EFFECT OF CHITOSAN DERIVATIVE INCORPORATION ON IMMUNOGENIC PROPERTIES OF PROTEIN NANOPARTICLES

Shcherbinina T. S.<sup>1</sup>, Zubareva A. A.<sup>1</sup>, Varlamov V. P.<sup>1</sup>,  
Svirshchevskaya E. V.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Centre "Bioengineering" of the RAS; <sup>2</sup>M.M. Shemyakin and Yu.A. Ovchinnikov Institute of bioorganic chemistry of the RAS, Moscow, Russia

Modernly there are no effective antiviral vaccines due to inability to induce cytotoxic cellular immune response by synthetic antigens. The aim of this work was to study the effect of chitosan derivative incorporation into lactoferrin nanoparticles (LN) on humoral and cellular immune response against lactoferrin. We have developed three types of particles: LN, LN with succinoyl-chitosan incorporation (LNS), and LNS coated by chitosan (LNSC). LN and LNS were obtained by controlled thermal treatment. LNS were additionally coated by low molecular weight chitosan via polyelectrolyte complex formation. BALB/c mice were immunized i.p. by nanoparticles without additional adjuvants. Antigen specific IgG production and humoral immune response was estimated after 3 immunizations. We showed that a comparable humoral response was formed in all groups. T-cell proliferation was significantly higher in mice immunized with chitosan incorporating particles. There was no difference between proliferating CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cell numbers in LNS and LNSC groups. We concluded that chitosan incorporation into protein vaccines stimulates cellular response while preserving humoral one.

**Раздел 8**  
**ИММУНИТЕТ**  
**И ИНФЕКЦИЯ, ВИЧ**

## АКТИВАЦИЯ МОНОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ, СТИМУЛИРОВАННЫХ ИММУННЫМИ КОМПЛЕКСАМИ, СОДЕРЖАЩИМИ АНТИГЕНЫ ВИЧ

Королевская Л. Б., Шмагель К. В.,  
Слободчикова С. В.

*Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь, Россия*

Проведена оценка участия иммунных комплексов, сформированных на основе антигенов ВИЧ и противовирусных антител, в активации мононуклеарных клеток ВИЧ-инфицированных больных, не получающих противовирусную терапию. Выявлено, что стимуляция моноцитов как ВИЧ-инфицированных, так и здоровых людей иммунными комплексами приводит к существенному повышению интенсивности люминолзависимой хемилюминисценции. Установлено, что в отличие от клеток здоровых доноров, реакция моноцитов ВИЧ-инфицированных больных на иммунные комплексы не приводит к увеличению доли CD14<sup>+</sup> клеток, синтезирующих IL-6, что, по-видимому, связано с высокой степенью активации клеток врожденного иммунитета инфицированных пациентов.

*Ключевые слова:* иммунные комплексы, ВИЧ-инфекция, активация иммунитета, антигенпрезентирующие клетки.

Существуют различные гипотезы, объясняющие причины истощения CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов при ВИЧ-инфекции. Установлено, что основой патогенеза и сильным прогностическим фактором развития заболевания является иммунная активация [1, 2]. Точные причины ее остаются малоизвестными. На сегодняшний день наиболее популярна гипотеза микробной транслокации, согласно которой бактериальные продукты, поступающие из кишечника, стимулируют клетки врожденного иммунитета, которые вызывают активацию Т-лимфоцитов [3]. Касаясь вопроса о роли антигенпрезентирующих клеток, нами была представлена модифицированная гипотеза активации иммунокомпетентных клеток при ВИЧ-инфекции [4]. Ее суть: активация Т-лимфоцитов происходит под влиянием антигенпрезентирующих клеток, стимулированных иммунными комплексами.

**Целью** настоящей работы была оценка способности иммунных комплексов, в состав которых входят антигены ВИЧ, активировать моноциты периферической крови.

**Методы исследования.** В работе была использована венозная кровь, полученная

от 10 здоровых доноров и 10 ВИЧ-инфицированных пациентов, не принимающих противовирусную терапию. От каждого участника исследования получено письменное информированное согласие. Средний возраст здоровых и ВИЧ-инфицированных людей составил 38,2±4,2 лет и 33,3±3,2 лет соответственно, в каждой группе преобладали женщины (70%). Мононуклеарные клетки выделяли путем центрифугирования в градиенте плотности диаколла общепринятым методом. Модельные иммунные комплексы формировали на основе антигенов ВИЧ (планшет, в лунках которого сорбирована смесь рекомбинантных антигенов ВИЧ) и специфических противовирусных антител, присутствующих в плазме крови ВИЧ-инфицированных пациентов (Ag<sup>+</sup>At<sup>+</sup>). Контрольные пробы содержали антигены ВИЧ с плазмой крови здоровых добровольцев без вирус-специфических антител (Ag<sup>+</sup>At<sup>-</sup>) и антигены ВИЧ с раствором Хэнкса (Ag<sup>+</sup>). После внесения мононуклеарных клеток пробы культивировали в течение суток. Оценка внутриклеточной экспрессии IL-6 в популяции CD14<sup>+</sup> моноцитов проводили методом проточной цитометрии



(BD FACSCalibur) с использованием моноклональных антител anti-human CD14 FITC, IL-6 PE и соответствующих изотипических контролей (BioLegend). Взаимодействие моноцитов периферической крови с модельными иммунными агрегатами оценивали по генерации клетками активных форм кислорода в люминолзависимой хемилюминисценции (Luminoskan Ascent). Достоверность различий между группами проводили на основе *t*-критерия Стьюдента.

**Результаты.** Моноциты периферической крови, стимулированные *in vitro*, продуцируют IL-6 независимо от наличия или отсутствия иммунных комплексов в пробе. Вместе с тем, установлено, что уровень продукции цитокина клетками здоровых доноров возрастает при их активации комплексами антиген-антитело. Относительное количество IL-6<sup>+</sup> моноцитов, стимулированных иммунными комплексами, состоящими из антигенов ВИЧ и противовирусных антител (Ag<sup>+</sup>Ag<sup>+</sup>), было значительно выше по сравнению с соответствующим показателем, установленным в пробах, не содержащих иммунных агрегатов (Ag<sup>+</sup>Ag<sup>-</sup>). Доля CD14<sup>+</sup>IL-6<sup>+</sup> моноцитов составила 57,1±4,4% и 39,4±5,3% соответственно ( $P < 0,05$ ). Относительное число IL-6<sup>+</sup> клеток, стимулированных только антигенами ВИЧ (Ag<sup>+</sup>), было ниже и составило 29,6±4,5% ( $P_{\text{к группе Ag}^+\text{Ag}^+} < 0,001$ ).

Продукция данного цитокина моноцитами ВИЧ-инфицированных людей не зависела от того, находится антиген в составе иммунного комплекса или присутствует в свободном состоянии. Относительное количество CD14<sup>+</sup>IL-6<sup>+</sup> клеток, стимулированных иммунными комплексами (Ag<sup>+</sup>Ag<sup>+</sup>) и антигенами ВИЧ (Ag<sup>+</sup>), составило 63,2±3,8% и 65,0±7,0% соответственно. В пробе, содержащей антигены ВИЧ и плазму крови без вирус-специфических антител (Ag<sup>+</sup>Ag<sup>-</sup>), доля CD14<sup>+</sup>IL-6<sup>+</sup> моноцитов составила 66,0±6,5%. Можно предположить, что изначальный уровень IL-6-продуцентов в крови больных был предельно высоким и, вероятно, не мог быть увеличен дополнительной стимуляцией.

Вместе с тем в клетках ВИЧ-инфицированных людей сохранялась способность к продукции активных форм кислорода при взаимодействии с иммунными агрегатами. Установлено значительное повышение интенсивности люминолзависимой хемилюминисценции моноцитов, стимулированных иммунными ком-

плексами, в состав которых входят антигены ВИЧ. Сила свечения в пробах, содержащих (Ag<sup>+</sup>Ag<sup>+</sup>) и не содержащих (Ag<sup>+</sup>Ag<sup>-</sup>) специфических антител, формирующих иммунные комплексы, составила 28,8±3,5 RLU и 9,1±1,4 RLU соответственно ( $P < 0,001$ ). Аналогичные результаты были получены при стимуляции моноцитов крови здоровых добровольцев. Интенсивность свечения в отсутствие иммунных агрегатов (Ag<sup>+</sup>Ag<sup>-</sup>) была относительно невысокой и составила 7,0±0,9 RLU. При этом взаимодействие моноцитов с иммунными комплексами, сформированными на основе антигенов ВИЧ и специфических антител (Ag<sup>+</sup>Ag<sup>+</sup>), сопровождалось существенным повышением интенсивности люминисценции клеток. Ее уровень составил 20,4±4,0 RLU ( $P < 0,01$ ). Следует отметить, что при стимуляции клеток только антигенами ВИЧ (Ag<sup>+</sup>) интенсивность свечения моноцитов как ВИЧ-инфицированных, так и здоровых людей была относительно невысокой. Уровень люминисценции клеток составил 3,7±0,5 RLU и 2,8±0,7 RLU соответственно. Эти показатели достоверно отличались от соответствующих значений, полученных в пробах, не содержащих комплексов антиген-антитело ( $P < 0,01$ ).

Таким образом, на основании полученных данных установлено, что иммунные комплексы, в состав которых входят антигены ВИЧ, способны активировать антигенпрезентирующие клетки. Взаимодействие моноцитов здоровых доноров с иммунными комплексами, сформированными антигенами ВИЧ и противовирусными антителами, приводит к значительному увеличению относительного количества CD14<sup>+</sup> клеток, продуцирующих IL-6. Кроме того, стимуляция моноцитов периферической крови такими комплексами сопровождается существенным усилением генерации активных форм кислорода.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ-Урал № 13-04-96012-р\_урал\_а.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Grossman Z., Meier-Schellersheim M., Sousa A. E. et al. Nat. Med. 2002, 8 (4), 319-323.
2. Hazenberg M. D., Otto S. A., van Benthem B. H. et al. AIDS 2003, 17, 1881-1888.
3. Brenchley J. M., Price D. A., Douek D. C. Nat. Immunol. 2006, 7 (3), 235-239.
4. Шмагель К. В., Королевская Л. Б., Черешнев В. А. Иммунология 2014, 35 (2), 117-120.

## ACTIVATION OF PERIPHERAL BLOOD MONOCYTES STIMULATED WITH IMMUNE COMPLEXES CONTAINING HIV ANTIGENS

Korolevskaya L. B., Shmagel K. V., Slobodchikova S. V.

*Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms UB RAS, Perm, Russia*

Role of the immune complexes formed on the basis of HIV antigens and antiviral antibodies in the activation of mononuclear cells of HIV-infected patients not receiving antiviral therapy was assessed. Immune complexes stimulation-mediated monocytes luminal-dependent chemiluminescence significant increase was revealed in both HIV-infected and healthy subjects. In contrast to healthy donor cells the reaction of HIV-infected patient monocytes on immune complexes did not increase the proportion of CD14<sup>+</sup> cells expressing IL-6, which is apparently due to the high degree of activation of innate immune cells in infected patients.

## ОСОБЕННОСТИ ГУМОРАЛЬНОГО ЗВЕНА ИММУНИТЕТА И ЦИТОКИНОВОГО ПРОФИЛЯ У БОЛЬНЫХ ИНФЕКЦИОННОЙ ЭКЗЕМОЙ

Лукьянчикова Л. В., Лысенко О. В.

*ГБОУ ВПО «Южно-Уральский государственный медицинский университет»  
Министерства здравоохранения РФ; ГБУЗ «Областной кожно-венерологический  
диспансер № 3», Челябинск, Россия*

Цель исследования – Изучить изменения в некоторых показателях гуморального звена иммунитета и цитокинового профиля у больных инфекционной экземой, для дальнейшей оптимизации терапии заболевания. Материал и методы. Проведено обследование 100 больных инфекционной экземой, в сравнении с 30 условно здоровыми лицами. Производилась оценка уровней Ig A, Ig M, IgG, IgE, ЦИК, концентрации цитокинов IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-17, а также лактоферрина. Результаты. У больных инфекционной экземой в процессе развития заболевания сформировалось значительное изменение иммунной реактивности. Наиболее существенные отклонения от показателей здорового контингента выявлены в содержании ЦИК, IgA, IgM, IgG, IL-2 и IL-17.

*Ключевые слова:* инфекционная экзема, цитокиновый профиль, гуморальный иммунитет.

**Введение.** Экзема – острое или хроническое рецидивирующее аллергическое заболевание кожи, формирующееся под влиянием экзогенных и эндогенных триггерных факторов и характеризующееся появлением полиморфной сыпи, острой воспалительной реакцией, обусловленной серозным воспалением кожи, и сильным зудом. [1]. Среди множественных форм экземы наиболее частой разновидностью является микробная, составляющая более 50% всех клинических вариантов дерматоза. [1, 2, 3, 4]

Важность иммунных нарушений в патогенезе экземы не вызывает сомнений. [1, 2, 3, 5] Определено значение иммуногенетических осо-

бенностей (ассоциации с антигенами HLA-B22 и HLA-C1), иммунного воспаления в коже на фоне подавления клеточного и гуморального иммунитета, угнетения неспецифической резистентности. Участие Т-лимфоцитов, в частности Th1, индуцирующих целый ряд провоспалительных цитокинов, таких как ИЛ-1, ИЛ-2, ФНО $\alpha$ , ИФН- $\gamma$ , дало основание некоторым авторам назвать это заболевание «цитокиновым дерматозом». Кроме того, иммунные девиации у больных экземой выявлены в самой коже, где отмечаются реакции, частично медиаторные Th2 лимфоцитами (на ранних стадиях) и Th1 лимфоцитами (на поздних стадиях) [2, 3, 5].

В конечном итоге, выход простагландинов, лейкотриенов, гистамина и т.д., вызывающих развитие в тканях воспаления, клинически проявляется ранним аллергическим ответом в виде гиперемии, отека, зуда [2, 3, 5].

Не меньший интерес вызывают изменения гуморального звена и цитокинового профиля у больных инфекционной экземой, девиации которых изучены в меньшей степени.

**Цель исследования.** Изучить изменения в некоторых показателях гуморального звена иммунитета и цитокинового профиля у больных инфекционной экземой, для дальнейшей оптимизации терапии заболевания.

**Материалы и методы.** Для достижения поставленной цели в 2009–2013 г. проведено исследования иммунного статуса у 100 пациентов с инфекционной экземой, в сравнении с 30 условно здоровыми лицами. Определение в сыворотке крови концентрации иммуноглобулинов классов А, М, G проводилось с помощью иммуноферментного анализа с тест-системами производства ВЕКТОР БЕСТ (г. Новосибирск). Концентрация общего иммуноглобулина Е в сыворотке крови выявлялась методом твёрдофазного иммуноферментного анализа («Вектор-Бест», г. Новосибирск). Уровень IL-17, IL-4, IFN- $\gamma$  оценивали методом иммуноферментного анализа в микропланшетном формате с регистрацией результатов на ридере «MultiscanPlus» фирмы «Labsystems» (Финляндия) с применением реактивов фирмы ООО «Цитокин» (г. Санкт-Петербург). Статистический анализ данных проводили с помощью пакетов прикладных программ Microsoft Excel 2007 и STATISTICA 6.0 (for Windows; «StatSoft, Inc.», 2001).

**Результаты и обсуждения.** Исследование некоторых показателей гуморального иммунитета и цитокинового профиля у больных инфекционной экземой выявило широкий спектр девиаций различного уровня. Уровень циркулирующих иммунных комплексов в группе наблюдения был достоверно увеличен и достиг  $46,31 \pm 1,98$ , что в два раза выше его количества в контрольной группе. При инфекционной экземе наблюдалось снижение содержания Ig A в сравнении с контролем ( $0,89 \pm 0,04$  г/л и  $1,63 \pm 0,01$  г/л соответственно,  $p < 0,01$ ), подобные же отклонения имелись в отношении Ig M ( $1,01 \pm 0,04$  г/л и  $1,18 \pm 0,09$  г/л, соответственно;  $p < 0,05$ ). Уровень IgG, напротив оказался увеличенным ( $19,31 \pm 0,23$  г/л; контроль  $11,31 \pm 0,21$  г/л;  $p < 0,001$ ). Содержание в сыворотке крови IgE

было повышено у лиц с инфекционной экземой ( $10,32 \pm 1,32$  МЕ/мл), в сравнении с контролем ( $1,68 \pm 0,22$  МЕ/мл). Учитывая патогенетическую значимость в развитии инфекционной экземы, в сыворотке крови определена концентрация IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-17, а также лактоферрина. Выявлено достоверно большее содержание IL-2 ( $4,62 \pm 0,05$  пг/мл, по сравнению с контролем  $1,63 \pm 0,12$  пг/мл,  $p < 0,01$ ), что может свидетельствовать об активном островоспалительном процессе на системном уровне. Содержание IL-4 при инфекционной экземе не отличалось от показателей контроля. Отмечено достоверное повышение уровня IL-17 ( $20,78 \pm 0,93$  пг/мл, относительно показаний контроля  $16,32 \pm 1,77$  пг/мл,  $p < 0,001$ ) что, вероятно, связано с участием данного цитокина в развитии аллергического воспаления, а также с тем, что основной физиологической функцией этого цитокина является защита от инфекций. Количество IFN- $\gamma$  оказалось также достоверно повышенным ( $24,30 \pm 1,23$  пг/мл) по сравнению с контролем ( $13,04 \pm 2,29$  пг/мл). Содержание лактоферрина в сыворотке крови было, напротив, достоверно ниже, чем в контрольной группе и соответствовало  $897 \pm 30,10$  нг/мл при контроле  $1136 \pm 90,92$  нг/мл. Возможно, в некоторых случаях данное снижение может нарушать устойчивость к развитию бактериальной инфекции у пациентов с инфекционной экземой.

Таким образом, у больных инфекционной экземой в процессе развития заболевания сформировалось значительное изменение иммунной реактивности. Наиболее существенные отклонения от показателей здорового контингента выявлены в содержании ЦИК, IgA, IgM, IgG, IL-2 и IL-17.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Охлопков В. А. Федеральные рекомендации по ведению больных экземой. М., 2013
2. Бутов Ю. С., Родина Ю. А. // Российский журнал кожных и венерических болезней. – 2007. – № 3. – С. 33-37.
3. Потекаев Н. С. // Клиническая дерматология и венерология. – 2009. – № 1. С. 67-73.
4. Данилов С. И., Нечаева О. С., Пирятинская А. Б., Российский журнал кожных и венерических болезней. – 2005. – № 1. – С. 60-62.
5. Galli, E., Ciucci, A., Cersosimo, S. et al. // Int J Immunopatol Pharmacol. – 2010 Apr-Jun; – № 23 (2) – P. 671-5.

## FEATURES OF HUMORAL IMMUNITY AND CYTOKINE PROFILE IN PATIENTS WITH INFECTIOUS ECZEMA

Lukyanchikova L. V., Lysenko O. V.

South Ural state medical University; Regional dermatovenerologic dispensary № 3",  
Chelyabinsk, Russia

The aim of the study was to examine the changes in some indicators of humoral immunity and cytokine profile in patients with infectious eczema, for further optimization of the therapy of the disease. Material and methods. A study of 100 patients with infectious eczema, in comparison with 30 healthy individuals. The assessment was made Ig A, Ig M, IgG, IgE, CIC, the concentration of cytokines IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-17, as well as lactoferrin. Results. In patients with infectious eczema in the process of development of the disease formed a significant change in immune reactivity. The most significant deviations from that of a healthy contingent identified in the content of the CIC, IgA, IgM, IgG, IL-2 and IL-17.

**Keywords:** infectious eczema, cytokine profile, humoral immunity.

## ХАРАКТЕРИСТИКА КЛЕТОЧНОГО ИММУННОГО ОТВЕТА К F1 И LcrV ДОНОРОВ, ПРИВИТЫХ ЖИВОЙ ЧУМНОЙ ВАКЦИНОЙ

Ляпина А. М.<sup>1</sup>, Федорова В. А.<sup>1</sup>, Мотин В. А.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ФГБНУ «Саратовский научно-исследовательский ветеринарный институт»,  
Саратов, Россия; <sup>2</sup>Университет Техаса, Медицинский факультет, Галвестон, США

Живая чумная вакцина EV НИИЭГ (ЖЧВ) является уникальной моделью для изучения механизмов протективного иммуногенеза при чуме. В работе был исследован клеточный ответ и продукция Th1/Th2/Th17-цитокинов на основные иммунодоминантные антигены чумного микроба – F1 и LcrV, очищенные и содержащие примеси бактериального липополисахарида (ЛПС), лимфоцитами доноров, многократно вакцинированных ЖЧВ. Несмотря на зафиксированный низкий уровень клеточной пролиферации, показана Th1-направленность специфического ответа на F1 у вакцинированных. Продемонстрирована тенденция к снижению Th2- и Th17- цитокинов, индуцированная очищенными от ЛПС F1 и LcrV, и к усилению их продукции при воздействии ЛПС-содержащих антигенов.

**Ключевые слова:** *Yersinia pestis*, EV НИИЭГ, F1, LcrV, Th1/Th2/Th17- цитокины, вакцинированные доноры.

**Актуальность и цель работы.** Изучение протективного иммуногенеза при чуме остается актуальным вопросом современной иммунологии, обусловленным, как особенностями взаимодействия возбудителя с организмом хозяина – способностью *Yersinia pestis* избегать эффективного иммунного ответа за счет продукции целого ряда защитных факторов (образование капсулы, наличие секретиции 3-го типа, термоиндуцибельная модификация липополисахарида и др.), так и отсутствием современ-

ных вакцинных препаратов, обеспечивающих длительный протективный иммунитет против всех форм инфекции. Живая чумная вакцина (ЖЧВ) – аттенуированный штамм *Y. pestis* EV НИИЭГ – остается единственной в мире лицензированной вакциной, эффективной против бубонной и легочной формы, и представляет собой уникальную модель для выяснения механизмов иммуногенеза при чуме. Предполагается, что ЖЧВ преимущественно стимулирует клеточный Th1-иммунитет [1],

однако характеристика последнего на сегодняшний день не является достаточно полной. Недавно на модели дефицитных по В-клеткам мышей, вакцинированных штаммом *Y. pestis*, аттенуированным за счет продукции шестиацильного ЛПС, была показана значительная роль Th17-опосредованного иммунитета в защите против экспериментальной чумы [2], однако на модели ЖЧВ подобных исследований не проводилось.

**Целью** работы являлось изучение специфической клеточной пролиферации и продукции Th1-, Th2- и Th17-ассоциированных цитокинов лимфоцитами доноров, вакцинированных ЖЧВ, в ответ на стимуляцию иммунодоминантными антигенами *Yersinia pestis* – F1 и LcrV.

**Материалы и методы.** Для изучения специфической активации лимфоцитов и оценки антиген-стимулированной продукции IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-17A использовали метод бластной трансформации лимфоцитов с последующим количественным определением цитокинов в супернатантах от стимулированных мононуклеаров периферической крови (МНК). МНК выделяли из гепаринизированной крови доноров с различным количеством вакцинаций ЖЧВ (группа А, 12 человек) и невакцинированных контрольных доноров (группа В, 2 человека) на градиенте плотности 1,077 г/мл и культивировали по общепринятой методике. Для специфической стимуляции клеток использовали рекомбинантные антигены *Y. pestis* F1 и LcrV, полученные путем клонирования и экспрессии в *E. coli* в форме гистидин-меченных белков и очищенные аффинной хроматографией на Ni<sup>2+</sup>-содержащей матрице до (обозначены как F1-LPS и LcrV-LPS) и после (F1 и LcrV, соответственно) их освобождения от примесей липополисахарида (ЛПС) *E. coli*. Каждый антиген добавляли в лунки с МНК в концентрациях 2 мкг/мл (F1) и 5 мкг/мл (LcrV, F1-LPS, LcrV-LPS). В качестве контролей использовали МНК без стимуляции антигенами, а также конканавалин А (ConA) (1 мкг/мл) и двухсуточные инактивированные бактериальные взвеси вакцинного штамма EV НИИЭГ, выращенные при температурах 26 °С (EV-26) и 37 °С (EV-37). Клеточную пролиферацию оценивали на шестые сутки культивирования с применением хемилюминесцентного набора по измерению включения BrdU в ДНК делящихся лимфоцитов (Roche). Индекс пролиферации определяли по формуле: ИП = rlu/s

в стимулированной культуре /rlu/s в культуре без антигена. Концентрации IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-17A измеряли в супернатантах, отобранных на пятые сутки культивирования, с использованием отечественных коммерческих наборов для определения цитокинов человека.

**Результаты и обсуждение.** МНК как вакцинированных, так и контрольных доноров демонстрировали высокие индексы пролиферации в лунках с положительными контролями (ConA, EV-26, EV-37). Оценка антиген-индуцированного бластообразования показала, что стимуляция лимфоцитов группы А антигенами F1, LcrV, F1-LPS, LcrV-LPS вызывала невысокий уровень пролиферации: М $\pm$ м ИП (F1) – 1,22 $\pm$ 0,18; М $\pm$ м ИП (LcrV) – 1,22 $\pm$ 0,13; М $\pm$ м ИП (F1-LPS) – 2,28 $\pm$ 0,32; М $\pm$ м ИП (LcrV-LPS) – 1,2 $\pm$ 0,14. При этом была отмечена некоторая иммуносупрессия, в большей степени выраженная при стимуляции F1 (ИП < 1 у 41,7%). Аналогичный показатель для F1-LPS составил 8,3%, для LcrV и LcrV-LPS – 33,3%. Повышение ИП при стимуляции F1-LPS скорее всего объясняется примесью бактериального ЛПС, обладающего способностью к неспецифической поликлональной активации лимфоцитарных клеток [3]. Лимфоциты невакцинированных доноров в целом активнее (в 1,5 раз) отвечали на воздействие всех использованных вариантов антигенов. Продукция IL-4 и IL-17A у доноров обеих групп демонстрировала большое разнообразие. Спонтанная продукция IL-4 и IL-17A в культуре нестимулированных лимфоцитов наблюдалась у 75% и 33,3% вакцинированных, соответственно, и у 100% контрольных доноров. При этом уровень IL-4 у последних в пять раз превышал таковой у вакцинированных, тогда как спонтанная продукция IL-17A была незначительно (в 1,14 раз) выше в опытной группе. Антигенная стимуляция индуцировала однонаправленные изменения уровней IL-4 и IL-17A в обеих группах: F1 и LcrV вызывали снижение продукции цитокинов у большего числа доноров, а ЛПС-содержащие антигены F1-LPS и LcrV-LPS – их повышение. Вероятно, продукция IL-4 и IL-17A была ассоциирована с неспецифическим воздействием бактериального ЛПС. Изучение продукции IFN- $\gamma$  не выявило детектируемых концентраций данного цитокина в супернатантах от нестимулированных лимфоцитов в обеих группах добровольцев. Стимуляция F1 индуцировала продукцию IFN- $\gamma$  у 25%, а F1-LPS – у 66,7% вакцинирован-

ных при отсутствии ответа в контрольной группе. Специфическая стимуляция V-антигена независимо от наличия/отсутствия ЛПС в препарате не индуцировала образования детектируемых уровней IFN- $\gamma$  в супернатантах обеих групп доноров, что согласуется с наблюдениями о способности LcrV подавлять продукцию провоспалительных цитокинов [4].

Таким образом, полученные в настоящем исследовании данные свидетельствуют о достаточно низком уровне специфического клеточного ответа на известные иммунодоминантные антигены чумного микроба – F1 и LcrV. Нами была зафиксирована продукция IFN- $\gamma$  у 25% доноров группы А при стимуляции F1, что характеризует Th1-направленность ответа на данный антиген у иммунореактивных вакцинированных ЖЧВ доноров. Оценка цитокинового профиля при стимуляции LcrV не позволяет сделать однозначного вывода о преобладании того или иного типа иммунного ответа и требует дальнейшего прояснения.

Влияние примесей бактериального ЛПС, описанное в данном исследовании (увеличение ИП, продукции IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-17A), должно всегда учитываться при изучении клеточного иммунитета, поскольку может влиять на характер синтеза основных цитокинов (IL-4, IL-17A). Несмотря на то, что в исследовании не было получено данных, подтверждающих Th17-зависимый характер иммунного ответа на F1 и LcrV у вакцинированных ЖЧВ, изучение данного вопроса представляется перспективным.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Firstova V.V. et al. *Adv Exp Med Biol* 2012, 954, 173-177.
2. Lin Jr-S. et al. *J Immunol* 2011, 186 (3), 1675-1684.
3. Лимфоциты: Методы. Под ред. Дж. Клауса. Мир, Москва 1990.
4. Nakajima R. et al. *Infect Immun* 1995, 63, 3021-3029.

### CHARACTERISTICS OF CELLULAR IMMUNE RESPONSE TO F1 AND LcrV IN HUMANS IMMUNIZED WITH LIVE PLAGUE VACCINE

Lyapina A. M.<sup>1</sup>, Feodorova V. A.<sup>1</sup>, Motin V. L.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Saratov Scientific and Research Veterinary Institute, Saratov, Russia;*

<sup>2</sup>*University of Texas Medical Branch, Galveston, USA*

Live plague vaccine (LPV) represents a unique model to examine the immune mechanisms involved in eliciting protection against plague. In our study cellular immune response and Th1/Th2/Th17-polarisation to major immunodominant antigens, such as F1 and LcrV, containing traces of bacterial lipopolysaccharide (LPS) and LPS-free, were investigated among donors vaccinated with LPV. Although the level of lymphocyte proliferation was low, it was possible to register Th1-mediated immune response to F1 antigen in vaccinees. Moreover, the LPS-free F1 and LcrV had a tendency to reduce the production of Th2- and Th17-cytokines, while LPS-containing antigens provided their stimulation.

## ОСНОВНЫЕ ПАРАМЕТРЫ ИММУННОГО СТАТУСА У ДЕТЕЙ С ОСТРОЙ ПНЕВМОНИЕЙ, АССОЦИИРОВАННОЙ С TORCH ИНФЕКЦИЕЙ

Мирсалихова Н. Х.

*Республиканский специализированный научно-практический медицинский центр  
Педиатрии МЗ РУз, Ташкент, Узбекистан*

Результаты иммунологических исследований выявили в 1-й группе больных детей снижение уровня CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>. Как в первой, так и во второй группе, был достоверно снижен уровень CD20<sup>+</sup>, что может свидетельствовать о слабой противоинфекционной резистентности организма. Содержание иммуноглобулинов А, G, М у детей 1-й группы было в пределах нормы, хотя те или иные отклонения в их содержании. Во второй группе имело место достоверное, по отношению к контролю и к 1-й группе, снижение содержания IgG и IgM и повышение IgA. Таким образом, проведенные иммунологические исследования показали, что иммунные нарушения при инфекционных заболеваниях способствуют усугублению иммунодефицита.

*Ключевые слова:* острая пневмония, дети, TORCH инфекция, иммунитет.

**Актуальность.** В настоящее время иммунный ответ при бронхолегочных заболеваниях у детей рассматривается как сложный комплекс антигенспецифических и неспецифических иммунологических реакций воспаления, регулируемых широким спектром «эндогенных иммуномодуляторов». Обязательным компонентом патогенеза вирусных инфекций считается неспецифическая иммуносупрессия, механизмы формирования которой и её патогенетическая роль, в частности при бронхопневмонии, дискутируются [3, 4]. Рядом исследований продемонстрирована взаимосвязь между выраженностью неспецифической иммуносупрессии и интенсивностью специфического антительного ответа на вирус-возбудитель, в частности при бронхопневмонии, отягощенной TORCH инфекциями, у новорожденных, детей первого года жизни и от 1 года до 6 лет [1, 2]. По-видимому, формирование разных типов иммунного ответа, с преобладанием тех или иных эффекторных механизмов иммунологической защиты тесно связано с уровнем и естественной, и приобретенной резистентности к возбудителю инфекции.

Вышесказанное иллюстрирует тот факт, что механизмы выздоровления детей от бронхолегочной патологии будут неодинаковыми. Это ставит вопрос о целесообразности разработки принципиально новых, дифференцирован-

ных подходов к лечению детей в зависимости от реализуемого типа иммунного ответа.

**Цель исследования:** изучить некоторые параметры клеточного и гуморального иммунитета у детей с острой пневмонией, ассоциированной с TORCH инфекцией.

**Материалы и методы.** Иммунологические исследования были выполнены в Институте Иммунологии АН РУз и включали определение количества Т-лимфоцитов (CD3) и субпопуляций: Т-хелперов (CD4), Т-супрессоров (CD8), естественных киллеров (CD16), В-лимфоцитов (CD19) модифицированным методом Гариба Ф. Ю. (1995), а также концентрацию сывороточных иммуноглобулинов А, М, G в периферической крови – по методу Manchini G. et al (1965); фагоцитарную активность нейтрофилов по методу Петрова Р. В. (1988). В основу работы положены результаты исследований проведенных у 45 детей, больных острой пневмонией ассоциированной с TORCH инфекцией. Обследование и лечение проводилось в отделении пульмонологии, возраст пациентов, находящихся на стационарном лечении, составлял от 6 месяцев до 3 лет (20 мальчиков, 25 девочек). Анализ лабораторных исследований позволил нам разделить детей с выявленной инфекцией на 2 группы: 1-я группа с вирусом простого герпеса (ВПГ) – 18 (40%) и 2-я группа детей со смешанной инфекцией – ВПГ

и микоплазма – 27 (60%). Контрольную группу составили 20 практически здоровых детей того же возраста. Обоснованием для постановки диагноза являлись жалобы, данные анамнеза, общеклинических (физикальных данных) и рентгенологических исследований. Для подтверждения диагноза TORCH инфекции применяли реакцию непрямой иммунофлюоресценции и полимеразную цепную реакцию (институт иммунологии АНРУз).

**Результаты и их обсуждение.** Результаты иммунологических исследований выявили следующие особенности иммунного статуса у детей с острой пневмонией, ассоциированной TORCH-инфекцией. В 1-й группе больных детей снижение уровня CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> наблюдалось только у 1/4 больных. В среднем по группе изменения этих субпопуляций были недостоверны. Как в первой, так и во второй группе, был достоверно снижен уровень В-лимфоцитов (CD20<sup>+</sup>), что может свидетельствовать о слабой противoinфекционной резистентности организма. Содержание иммуноглобулинов А, G, М у детей 1-й группы было в пределах нормы, хотя те или иные отклонения в их содержании (чаще всего повышение уровня IgА и/или снижение – IgG) наблюдались у 2/3 больных детей. Во второй группе имело место достоверное, по отношению к контролю и к 1-й группе, снижение содержания IgG и IgM и повышение IgA.

Таким образом, проведенные иммунологические исследования показали, что иммунные нарушения у данных детей способствуют усугублению иммунодефицита. Характер иммунной патологии при осложненном течении TORCH-инфекции, а в особенности сочетан-

ной формы инфекции имеет ряд особенностей. Угнетение в Т-звене настолько глубоко, что затрагивает все изучавшиеся субпопуляции Т-лимфоцитов. Особенности состояния факторов иммунитета у детей 2-й группы свидетельствуют о преобладании иммуносупрессивных реакций иммунитета, способствующих персистенции инфекции, диссеминации ее в организме, что клинически выражается хронизацией процесса, торпидностью течения, многоочаговостью поражения, склонностью к формированию осложнений.

**Выводы.** У детей с острой пневмонией, ассоциированной с TORCH инфекцией наблюдается более выраженная иммунная дисфункция, выражающаяся в изменении содержания основных субпопуляций лимфоцитов и недостаточности гуморального звена иммунитета.

Характер иммунной патологии при этом в особенности сочетанной формы инфекции имеет ряд особенностей. Угнетение в Т-звене настолько глубоко, что затрагивает все изучавшиеся субпопуляции Т-лимфоцитов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Лебедев К. А., Понякина И. Д. Иммунная недостаточность (выявление и лечение). М., Медицинская книга; Н. Новгород, Изд-во НГМА, 2003.
2. Практическая пульмонология детского возраста (справочник) /Под.ред. В. К. Таточенко.– М., 2000.– С.115-116, 132-133.
3. Хаитов Р. М. Физиология иммунной системы М.2005: 375.
4. Хаитов Р. М., Пинегин Б. В. Оценка иммунного статуса в норме и при патологии. // Ж-л «Иммунология».– 2001.– № 4.– С. 4-6.

### BASIC PARAMETER OF THE IMMUNE STATUS IN CHILDREN WITH ACUTE PNEUMONIA ASSOCIATED WITH TORCH INFECTION

Mirsalikhova N. Kh.

*Republican Specialized Scientific and Practical Medical Center of Pediatrics  
Ministry of Health of the Republic of Uzbekistan, Tashkent, Uzbekistan*

It is well known that during active development of acute pneumonia there is observed activation of phagocytosis. Some authors reported about low values of neutrophile phagocytary activity (NPA) in the active period of bronchopneumonia. There were revealed specific differences in the intensity of changes of the immunoglobulin levels in relation to premorbid state. Thus, our investigations showed that during treatment of pneumonia with herpes virus infection with use of traditional methods body immunological response to inflammatory process has been preserved during the period of clinical recovery. The inhibition of relative and absolute quality of T-cells may be related with block of T-lymphocyte receptors or their damage due to effect of viruses.

*Key words:* acute pneumonia, children, TORCH infection, immunity.



## ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ПОЛИФУНКЦИОНАЛЬНЫХ КЛЕТОК У БОЛЬНЫХ ТУБЕРКУЛЕЗОМ ЛЕГКИХ

Пантелеев А. В., Никитина И. Ю., Васильева И. А., Лядова И. В.

ФГБНУ «ЦНИИТ», Москва, Россия

В связи с распространением заболеваемости туберкулезом большое значение имеет разработка методов выявления заболевания в активной форме на основе анализа доступного биологического материала, в первую очередь – образцов крови. Недавно для дифференциальной диагностики активного ТБ и латентной туберкулезной инфекции, был предложен подход, основанный на определении процентного содержания в крови полифункциональных (ПФЛ) *Mtb*-специфичных лимфоцитов CD4, продуцирующих одновременно несколько цитокинов (INF- $\gamma$ <sup>+</sup>TNF- $\alpha$ <sup>+</sup>IL-2<sup>+</sup>), а также лимфоцитов, продуцирующих только TNF- $\alpha$  (INF- $\gamma$ <sup>-</sup>TNF- $\alpha$ <sup>+</sup>IL-2<sup>-</sup>). В работе проведен пилотный анализ содержания этих клеток у больных ТБ, условно здоровых доноров и лиц, имеющих длительный контакт с ТБ инфекцией («контактов»). Показано, что у больных ТБ отмечается более низкое содержание ПФЛ (0,096±0,020%), чем у здоровых доноров (0,240±0,043%) и «контактов» (0,135±0,028%). Согласно полученным пилотным данным, содержание ПФЛ позволяет различать больных и здоровых доноров с чувствительностью 72,7% и специфичностью 88,2%. Среди других популяций наибольшие различия между больными ТБ, «контактами» и условно здоровыми донорами отмечались по содержанию монофункциональных лимфоцитов INF- $\gamma$ <sup>-</sup>TNF- $\alpha$ <sup>+</sup>IL2<sup>-</sup>, их содержание составило 0,17±0,05%, 0,07±0,01% и 0,08±0,01%, соответственно ( $p=0.001$  по сравнению с «контактами» и  $p=0.01$  по сравнению с условно здоровыми донорами). Построение ROC кривых показало, что содержание лимфоцитов INF- $\gamma$ <sup>-</sup>TNF- $\alpha$ <sup>+</sup>IL2<sup>-</sup> позволяет различать больных ТБ и «контактов» с чувствительностью 66,7% и специфичностью 82,4% (пороговое значение показателя – 0,079%, AUC-0,82). Возможность использования данных показателей для определения активности ТБ инфекции требует дополнительных исследований.

**Ключевые слова:** туберкулез, полифункциональные лимфоциты, проточная цитофлюориметрия.

**Актуальность и цель работы.** Заболеваемость туберкулезом (ТБ) продолжается оставаться серьезной глобальной проблемой для медицины. Несмотря на значительные успехи клинической и лабораторной диагностики ТБ, сохраняется потребность в разработке метода, позволяющего быстро выявлять наличие заболевания в активной форме путем анализа доступного биологического материала, в первую очередь, крови. К методам иммунологической диагностики ТБ, основанным на использовании образцов крови, относятся «интерфероновые» тесты (IGRAs), в которых о наличии инфекции судят по уровню продукции IFN-g (тест «QuantiFERON®TB Gold In-Tube») или частоте IFN-g продуцирующих клеток (тест T-SPOT.TB) в образцах крови, стимулированных *in vitro* антигенами, специфичными для микобактерий ТБ (*Mtb*). Однако методы IGRAs не позволяют определять активность ТБ инфекции и дифференцировать активный ТБ и степень инфицирования. В связи с этим в мире активно ведутся разработки но-

вых подходов к иммунологической диагностике ТБ, позволяющих судить об активности туберкулезного процесса. Одним из недавно предложенных подходов является метод, основанный на определении содержания в крови полифункциональных (ПФЛ) *Mtb*-специфичных лимфоцитов CD4. Полифункциональными принято называть лимфоциты, которые в ответ на стимуляцию антигенами продуцируют одновременно несколько цитокинов, например, INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  и IL2. Данные литературы о различиях в содержании *Mtb*-специфичных ПФЛ у больных ТБ и лиц с латентной туберкулезной инфекцией противоречивы. По данным одних авторов у лиц с латентной инфекцией содержание ПФЛ выше, чем у больных активным ТБ [1]. По данным других – картина обратная – содержание ПФЛ выше у больных активным ТБ [2].

**Целью** настоящего исследования явился анализ содержания *Mtb*-специфичных ПФЛ CD4 у больных ТБ, здоровых доноров и лиц, имеющих длительный контакт с ТБ инфекци-

ей («контактов»), а также анализ возможности использования определения содержания ПФЛ CD4 для оценки активности ТБ процесса.

**Материалы и методы.** В исследование были включены 17 больных, поступивших в ФГБНУ «ЦНИИТ» для лечения туберкулеза легких (7 женщин, 10 мужчин; возраст от 18 до 80 лет), 17 человек, имеющих длительный (более 1 года) контакт с больными ТБ (13 женщин, 4 мужчин; возраст от 25 до 65 лет) и 11 здоровых доноров (5 женщин, 6 мужчин; возраст от 25 до 60 лет). Среди больных ТБ у 8 пациентов был установлен диагноз инфильтративный туберкулез, у 4 – фиброзно-кавернозный туберкулез, у 5 – диссеминированный туберкулез.

Для определения содержания *Mtb*-специфичных ПФЛ клетки крови стимулировали *in-vitro* PPD и определяли процент лимфоцитов CD4, продуцирующих INF- $\gamma$ , IL-2 и TNF- $\alpha$  методом проточной цитометрии. При проведении анализа определяли процентное содержание популяций, продуцирующих INF- $\gamma$ , IL-2 и TNF- $\alpha$  одновременно (INF- $\gamma$ <sup>+</sup>TNF- $\alpha$ <sup>+</sup>IL-2<sup>+</sup>) или в различных комбинациях (INF- $\gamma$ <sup>+</sup>TNF- $\alpha$ <sup>-</sup>IL-2<sup>-</sup>, INF- $\gamma$ <sup>-</sup>TNF- $\alpha$ <sup>+</sup>IL-2<sup>+</sup>, INF- $\gamma$ <sup>+</sup>TNF- $\alpha$ <sup>-</sup>IL-2<sup>+</sup> и т.д., всего 8 популяций).

**Результаты.** Содержание ПФЛ (клеток с фенотипом INF- $\gamma$ <sup>+</sup>TNF- $\alpha$ <sup>+</sup>IL-2<sup>+</sup>) у больных ТБ было достоверно ниже, чем у условно здоровых доноров ( $p=0.0022$ ), однако не отличалось от содержания этих клеток у «контактов» ( $p=0.10$ ). Среди других популяций наибольшие различия между больными ТБ, «контактами»

и условно здоровыми донорами отмечались по содержанию монофункциональных лимфоцитов INF- $\gamma$ <sup>-</sup>TNF- $\alpha$ <sup>+</sup>IL2<sup>-</sup>, их содержание составило  $0,17\% \pm 0,05$ ,  $0,07\% \pm 0,01$  и  $0,08\% \pm 0,01$ , соответственно ( $p=0.001$  по сравнению с «контактами» и  $p=0.01$  по сравнению с условно здоровыми донорами). Построение ROC кривых показало, что содержание лимфоцитов INF- $\gamma$ <sup>-</sup>TNF- $\alpha$ <sup>+</sup>IL2<sup>-</sup> позволяет различать больных ТБ и «контактов» с чувствительностью 66,7% и специфичностью 82,4% (пороговое значение показателя – 0,079%, AUC-0,82).

У больных активным ТБ отмечается достоверно более высокое содержание монофункциональных лимфоцитов INF- $\gamma$ <sup>-</sup>TNF- $\alpha$ <sup>+</sup>IL2<sup>-</sup> чем у условно здоровых доноров и «контактов» и более низкое содержание ПФЛ CD4, чем у условно здоровых доноров. Возможность использования данных показателей для определения активности ТБ инфекции требует дополнительных исследований.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Harari A., Rozot V., Enders F.B., Perreau M., Stalder J.M., Nicod L.P., Cavassini M., Calandra T., Blanchet C.L., Jaton K., Faouzi M., Day C.L., Hanekom W.A., Bart P.A., Pantaleo G. *Nature medicine* 2011, 17, 372-376.
2. Caccamo N., Guggino G., Joosten S.A., Gelsomino G., Carlo P. Di, Titone L., Galati D., Bocchino M., Matarese A., Salerno A., Sanduzzi A., Franken W.P.J., Ottenhoff T.H.M. *European Journal of Immunology* 2010, 40 (8), 2211-2220.

## DETERMINATION OF POLYFUNCTIONAL CELLS IN PATIENTS WITH PULMONARY TUBERCULOSIS

Pantelev A. V., Nikitina I. Yu., Vasil'eva I.A., Lyadova I. V.

*Central Tuberculosis Research Institute (CTRI), Moscow, Russia*

It is important to develop methods of identifying active form of tuberculosis (TB) based on the analysis of blood samples. Recently, an approach to differentiate active and latent TB infection has been proposed, which is based on the analysis of polyfunctional (PFL) *Mtb*-specific CD4 lymphocytes able to produce several different cytokines (i.e., INF- $\gamma$ <sup>+</sup>TNF- $\alpha$ <sup>+</sup>IL-2<sup>+</sup>) and monofunctional lymphocytes that produce TNF- $\alpha$  (i.e., INF- $\gamma$ <sup>-</sup>TNF- $\alpha$ <sup>+</sup>IL-2<sup>-</sup>). We have examined the contents of *Mtb*-specific CD4 PFL in TB patients (PTB), healthy donors (HD) and individuals having the records of TB exposure (TBC). PTB had lower content of PFL cells ( $0,096 \pm 0,020\%$ ) as compared to HD ( $0,240 \pm 0,043\%$ ) and TBC ( $0,135 \pm 0,028\%$ ). The content of PFL allowed distinguishing between PTB and HD with a sensitivity of 72.7% and a specificity of 88.2%. Among other subsets, the most pronounced differences between PTB, TBC and HD were in the content of monofunctional lymphocytes INF- $\gamma$ <sup>-</sup>TNF- $\alpha$ <sup>+</sup>IL2<sup>-</sup>. These cells comprised  $0,17 \pm 0,05\%$ ,  $0,07 \pm 0,01\%$  and  $0,08 \pm 0,01\%$  of CD4 lymphocytes, respectively ( $p=0.001$  compared to TBC and  $p=0.01$  compared to HD). ROC curves showed that the content of INF- $\gamma$ <sup>-</sup>TNF- $\alpha$ <sup>+</sup>IL2<sup>-</sup> lymphocytes distinguished TBP and TBC with a sensitivity of 66.7% and a specificity of 82.4% (threshold, 0,079%, AUC-0, 82). Further investigations are needed to clarify if the determination of poly- and mono-functional lymphocytes can be used for active TB diagnostics.

## НАРУШЕНИЕ СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СВОЙСТВ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ КАК ФАКТОР РИСКА РАЗВИТИЯ ЭКССУДАТИВНОГО СРЕДНЕГО ОТИТА У ДЕТЕЙ С ХРОНИЧЕСКИМ АДЕНОИДИТОМ

Плешко Р. И.<sup>1,2</sup>, Кологривова Е. Н.<sup>1,2</sup>, Щербик Н. В.<sup>1,2</sup>,  
Староха А. В.<sup>1,2</sup>, Акбашева О. Е.<sup>1</sup>, Шевцова Н. М.<sup>1</sup>,  
Аргунова Н. А.<sup>1</sup>, Ситникова А. В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Сибирский государственный медицинский университет; <sup>2</sup>Томский филиал ФГБУ «Научно-клинический центр оториноларингологии ФМБА», Томск, Россия

Изучены содержание миелопероксидазы, катионных белков, кислой и щелочной фосфатазы в нейтрофилах (Нф) крови, число Нф в мазках-отпечатках со слизистой носа, активность эластазы и концентрация IL-8 в назальных смывах у детей с хроническим аденоидитом, осложненным экссудативным средним отитом. Выявлено значительное снижение содержания миелопероксидазы в Нф крови, уменьшение числа Нф на слизистой носа и концентрации IL-8 в назальных смывах, что может приводить к нарушению микробицидности слизистой оболочки и распространению воспаления.

*Ключевые слова:* нейтрофилы, микробицидность, хемокины, аденоидит, отит.

Воспалительные заболевания лимфоэпителиального глоточного кольца широко распространены среди детского населения (20-50%), что связано с функциональной незрелостью слизистых барьеров и иммунитета в целом. Как правило, первым звеном в цепи повреждений становятся аденоиды, воспаление в которых нередко приобретает хронический характер и может приводить к серьезным осложнениям, одним из которых является экссудативный средний отит (ЭСО) [1]. Эффективность защитных реакций на слизистых покровах у детей во многом определяется состоянием врожденного иммунитета, важной частью которого являются компоненты фагоцитарного звена [2].

Целью исследования стало изучение структурно-функциональных особенностей нейтрофильных (Нф) гранулоцитов у детей с хроническим аденоидитом (ХА), ассоциированным с ЭСО.

Исследованы мазки периферической крови, мазки-отпечатки со слизистой носа, назальные смывы 87 детей в возрасте от 3 до 7 лет (38 детей с ХА и 33 – с ХА, осложненным ЭСО, в состоянии ремиссии и 16 практически здоровых детей) без отягощенного аллергологи-

ческого анамнеза. Изучалось: число Нф в гемограмме и риноцитограмме (%); содержание миелопероксидазы, катионных белков, кислой фосфатазы и щелочной фосфатазы в Нф крови (с определением среднего цитохимического коэффициента); концентрация интерлейкина (IL)-8 (иммуноферментным методом) и активность эластазоподобных протеиназ в назальных смывах. Критический уровень значимости различий принимался, равным 0,05.

Анализ показал, что число Нф в лейкограмме крови у больных детей в среднем не отличалось от значений здоровых. Не получено каких-либо различий и в насыщенности гранулоцитов катионными белками, кислой и щелочной фосфатазой. Однако, цитохимическая оценка миелопероксидазы показала, что в Нф детей, больных ХА, ассоциированным с ЭСО, ее содержание было существенно снижено (2,23 (1,93–2,84)) как в отношении контрольных значений (2,78 (2,42–2,96),  $p=0,006$ ), так и показателей пациентов с не осложненным ХА (2,74 (2,34–2,89),  $p=0,02$ ).

Изучение назальных смывов продемонстрировало нарушение миграции Нф на слизистые оболочки у всех больных детей, что проявилось в уменьшении их числа в рино-

цитограмме до 12 (3–21)% при не осложненном ХА ( $p=0,01$ ) и 7 (3–26)% при ХА, ассоциированным с ЭСО (62 (40–83)% – у практически здоровых детей,  $p=0,001$ ). Это сочеталось с выраженным уменьшением в назальных смывах IL-8, концентрация которого снижалась у детей с не осложненным ХА до 345 (158–418) мг/г-белка (416 (379–501) мг/г-белка – в контроле;  $p=0,001$ ) и приобретала минимальные значения у пациентов с ЭСО (190 (130–269) мг/г-белка,  $p=0,001$ ). Известно, что IL-8 является главным хемокином для Нф, и низкая его концентрация на слизистой носа может свидетельствовать о нарушении процессов трансэпителиальной миграции лейкоцитов.

Биохимические исследования не выявили статистически значимых различий в показателях средней активности эластазы в назальных смывах у больных и здоровых детей. В связи с этим были проанализированы индивидуальные значения активности эластазы, позволившие разделить каждую клиническую группу на 3 подгруппы: с высокими показателями активности фермента (0,55–1,11 мкмоль БАНЭ/мл×мин), со сниженными значениями активности (0,15–0,25 мкмоль БАНЭ/мл×мин) и с параметрами, характерными для практически здоровых детей (0,38–0,48 мкмоль БАНЭ/мл×мин). Оказалось, что среди больных ХА преобладали лица с пониженной протеолитической активностью (50%), у 17% детей активность фермента была повышена, а у 33% находилась в пределах нормы. В то же время у 50% детей с осложненным ХА чаще наблюдалась повышенная, по сравнению с референтными значениями, активность эластазы ( $p=0,001$ ) и только у 29% детей активность фермента была снижена ( $p=0,018$ ).

Известно, что даже у практически здоровых лиц в условиях респираторной нагрузки отмечается приток нейтрофилов с хорошей поглощательной активностью, появляются эозинофилы и макрофаги. Микробицидная функция Нф зависит от количества и активности внутриклеточных ферментов. Миелопероксидаза относится к ключевым антимикробным ферментам, т.к. продуктами катализируемых реакций являются сильные окислители (в частности, гипохлорит), реактивные производные азота

и свободные радикалы. Биосинтез миелопероксидазы начинается в миелоцитах костного мозга и продолжается в ходе их дифференцировки до выхода зрелых гранулоцитов в кровеносное русло. Выявленное нами существенное уменьшение этого фермента в Нф крови может свидетельствовать о наличии неких дефектов в системе гранулоцитопозеза (врожденных или приобретенных) у детей с осложненной формой ХА. Вероятно, возникающее при этом снижение антимикробного потенциала микрофагоцитов могло стать основой для хронизации воспалительного процесса в аденоидах и его распространения в полость среднего уха.

Одним из патогенетических аспектов пролонгации воспаления и вовлечения близлежащих регионов могла быть усиленная активность другого фермента – эластазы, секретируемой в зоне воспаления нейтрофилами и способной к гидролизу эластиновых волокон соединительной ткани, протеогликанов, коллагена. Гисто- и цитолитические процессы, инициируемые действием этого фермента, безусловно, могли стать важным условием формирования ЭСО у детей с хроническим аденоидитом.

Нарушение барьерных функций верхних дыхательных путей у детей с ЭСО может быть связано и с выявленным нами уменьшением числа Нф в назальных смывах. Исследования последних лет говорят о важном значении трансэпителиальной элиминации фагоцитов для успешного разрешения воспаления на слизистых покровах [3]. Снижение числа Нф на поверхности носоглотки может быть опосредовано, в том числе, нарушением продукции IL-8, являющегося главным хемоаттрактантом для этих гранулоцитов.

Таким образом, при осложненном течении ХА снижена микробицидная способность Нф и угнетена их эмиграция на слизистые оболочки носоглотки.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дроздова М. В. / Российская оториноларингология. – 2011. – № 4 (53). – С. 62–68.
2. Тотолян А. А. / Клетки иммунной системы. – СПб.: Наука, 2001. – 390 с.
3. Persson C., Uller L. / British Journal of Pharmacology. – 2012. – 165. – P.2100–2109.

## THE DISORDER OF NEUTROPHILS STRUCTURAL AND FUNCTIONAL PROPERTIES AS A RISK FACTOR OF THE DEVELOPMENT OTITIS MEDIA WITH EFFUSION IN CHILDREN WITH ADENOIDITIS

Pleshko R. I.<sup>1,2</sup>, Kologrivova E. N.<sup>1,2</sup>, Sherbik N. V.<sup>1,2</sup>, Starocha A. V.<sup>1,2</sup>, Akbasheva O. E.<sup>1</sup>, Shevtcova N. M.<sup>1</sup>, Argunova N. A.<sup>1</sup>, Sitnicova A. V.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Siberian state medical university, Tomsk, Russia; <sup>2</sup>Tomsk branch "Scientific Clinical Center of Otorhinolaryngology of FMBA", Tomsk, Russia

The contents of myeloperoxidase, cationic proteins, acid and alkaline phosphatases in neutrophils in the blood, the number of neutrophils in the impression smears from the nasal mucosa, activity of elastase and concentration of IL-8 in nasal washes was investigated in children with chronic adenoiditis and otitis media with effusion. There was a significant decrease in the content of myeloperoxidase in blood neutrophils, decrease of the number of neutrophils in the nasal mucosa and concentration of IL-8 in nasal washes, which may lead to the disturbance of the microbicidal activity of the mucosa and promote the extension of the inflammation.

---

---

## ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ ИСТОЩЕНИЕ CD8<sup>+</sup> Т-ЛИМФОЦИТОВ НА ФОНЕ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ

Сайдакова Е. В.<sup>1</sup>, Королевская Л. Б.<sup>1</sup>, Шмагель Н. Г.<sup>2</sup>, Шмагель К. В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН; <sup>2</sup>Пермский краевой центр по борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями, Пермь, Россия

Исследована экспрессия маркера истощения (PD-1) на четырех основных субпопуляциях CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов ВИЧ-инфицированных пациентов с различной эффективностью восстановления иммунной системы при проведении антиретровирусной терапии. Показано, что у больных с неэффективным ответом на лечение происходит увеличение содержания CD8<sup>+</sup>PD1<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, затрагивающее, в основном, финальные этапы функционального созревания клеток, а именно терминальные эффекторы.

*Ключевые слова:* ВИЧ-инфекция, АРТ, CD8<sup>+</sup> Т-лимфоциты, истощение.

**Актуальность и цель работы.** В большинстве случаев назначение антиретровирусной терапии (АРТ) сопровождается подавлением вирусной нагрузки ВИЧ с последующим повышением численности CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов в крови. Однако у 10–30% пациентов количество этих клеток не увеличивается в течение длительного времени (дискордантный ответ на терапию). Причины неэффективного восстановления иммунной системы у части ВИЧ-инфицированных больных остаются неизвестными.

Важную роль в контроле ВИЧ-инфекции играют цитотоксические CD8<sup>+</sup> Т-лимфоциты, сдерживающие репликацию вируса и замедляющие развитие заболевания [1]. Из-за постоянной иммунной активации, вызванной

вирусными и бактериальными продуктами, CD8<sup>+</sup> Т-клетки подвергаются функциональному истощению, что выражается в постепенной потере способности к пролиферации, синтезу цитокинов и цитолитических агентов [2, 3].

**Целью** данной работы было установление уровня функционального истощения различных субпопуляций CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов в зависимости от эффективности восстановления иммунной системы пациентов на фоне антиретровирусной терапии.

**Материалы и методы.** Обследовано 80 ВИЧ-инфицированных пациентов и 20 условно здоровых добровольцев без ВИЧ-инфекции (контрольная группа – К). Каждый пациент дал письменное информированное согласие

на участие в исследовании. Все инфицированные больные до начала АРТ имели уровень CD4<sup>+</sup> Т-клеток в крови < 200/мкл, находились на терапии не менее двух лет, и к моменту обследования репликация ВИЧ у них была полностью подавлена. Исходя из уровня эффективности ответа на АРТ, больные были разделены на 2 группы: 1) ВИЧ<sup>+</sup>, число CD4<sup>+</sup> Т-клеток < 350/мкл (n=38) – дискордантный ответ на терапию (ДОТ); 2) ВИЧ<sup>+</sup>, число CD4<sup>+</sup> Т-клеток > 350/мкл (n=42) – стандартный ответ на терапию (СОТ).

Выделенные из венозной крови на градиенте плотности диаколла цитотоксические Т-клетки с фенотипом CD27<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup> определяли как наивные; CD27<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CCR7<sup>+</sup> лимфоциты – как клетки центральной памяти; CD27<sup>-</sup>CD45RA<sup>-</sup>CCR7<sup>-</sup> лимфоциты – как клетки эффекторной памяти, а CD27<sup>-</sup>CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup> лимфоциты – как терминальные эффекторы. Наличие поверхностного белка PD-1 рассматривалось как признак функционального истощения клетки. В выборке определяли медиану. Сравнение величин проводили по U-критерию Манна-Уитни.

**Результаты.** Распределение CD8<sup>+</sup> Т-клеток между исследованными субпопуляциями (наивные Т-лимфоциты, клетки центральной и эффекторной памяти, терминальные эффекторы) не имело статистически достоверных отличий у пациентов групп ДОТ, СОТ и К (P>0,05 при сравнении всех групп между собой). У группы ДОТ по сравнению с группой К было отмечено снижение абсолютного количества наивных CD8<sup>+</sup> Т-клеток в 1,8 раза (P<0,01), но трехкратное увеличение числа CD8<sup>+</sup> Т-клеток эффекторной памяти (P<0,01). При этом статистически достоверных отличий абсолютного количества CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов у пациентов групп ДОТ и СОТ ни в одной субпопуляции обнаружено не было (P>0,05).

Показано, что у больных группы ДОТ происходит увеличение доли PD-1<sup>+</sup> «истощенных» клеток в общей субпопуляции CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов относительно соответствующих показателей группы СОТ (P<0,01) и группы К (P<0,01). Однако этап функционального созревания, на котором цитотоксические CD8<sup>+</sup> Т-клетки подвергаются истощению у ВИЧ-инфицированных пациентов с дискордантным ответом на лечение, остается неизвестным.

Исследование экспрессии PD-1 на клетках различных субпопуляций CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов

выявило, что наивные Т-лимфоциты мало подвержены истощению, как при ВИЧ-инфекции, так и при дискордантном ответе на терапию (P>0,05 при сравнении трех групп между собой). Лишь небольшая доля этих клеток (не многим более 1%) экспрессировала маркер PD-1. Существенно больший уровень экспрессии PD-1 был отмечен на CD8<sup>+</sup> Т-клетках, ранее встречавших соответствующий антиген. Даже у относительно здоровых добровольцев доля PD-1<sup>+</sup> Т-лимфоцитов среди клеток центральной памяти составила 50%. При этом у ВИЧ-инфицированных пациентов групп ДОТ и СОТ отклонений от контрольных значений обнаружено не было (52% и 49% соответственно; P>0,05 при сравнении трех групп между собой). Доля CD8<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup> Т-клеток эффекторной памяти также была достаточно высокой. В группе СОТ отмечалось снижение уровня истощенных CD8<sup>+</sup> Т-клеток эффекторной памяти (35,8%) относительно соответствующих значений группы ДОТ (45,9%; PCOT-ДОТ<0,01) и группы К (50%; PCOT-К<0,05). В субпопуляции терминальных эффекторов было выявлено увеличение доли CD8<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup> Т-клеток у пациентов группы ДОТ (18,5%) относительно больных группы СОТ (14,9%; P<0,05). Следует отметить, что экспрессия молекулы PD-1 индуцируется постоянной стимуляцией лимфоцита через Т-клеточный рецептор [4]. Это объясняет низкий уровень экспрессии PD-1 на наивных CD8<sup>+</sup> Т-клетках, ранее не встречавших соответствующий антиген, и значительно (в десятки раз) увеличенное число CD8<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup> Т-лимфоцитов среди клеток памяти субъектов, зараженных ВИЧ.

Таким образом, проведенное исследование наглядно показало, что истощение CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов наблюдается не у всех больных ВИЧ-инфекцией, но только лишь у пациентов с дискордантным ответом на АРТ. При этом истощение затрагивает в основном финальные этапы созревания CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, а именно терминальные эффекторы.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Jin X., Bauer D. E., Tuttleton S. E. et al. J Exp Med 1999;189:991-998.
2. Day C. L., Kaufmann D. E., Kiepiela P. et al. Nature 2006;443:350-354.
3. Trautmann L., Janbazian L., Chomont N. et al. Nat Med. 2006;12:1198-1202.
4. Yamazaki T., Akiba H., Iwai H., et al. J Immunol. 2002; 169 (10):5538-5545.

## CD8<sup>+</sup> T CELL FUNCTIONAL EXHAUSTION DURING HIV-INFECTION

Saidakova E. V.<sup>1</sup>, Korolevskaya L. B.<sup>1</sup>, Shmagel N. G.<sup>2</sup>, Shmagel K. V.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms; <sup>2</sup>Perm Regional Center for Protection against AIDS and Infectious Diseases, Perm, Russia

PD-1 expression on the four major CD8<sup>+</sup> T cell subsets of HIV infected patients with different efficiency of the antiretroviral therapy mediated immune restoration was studied. It is shown that patients with poor response to the treatment have an increased content of CD8<sup>+</sup>PD1<sup>+</sup> T lymphocytes, especially at the final cell maturational stages, namely terminal effectors.

---

---

## РОЛЬ ГОМЕОСТАТИЧЕСКИХ ЦИТОКИНОВ IL-2 И IL-7 В НЕЭФФЕКТИВНОМ ВОССТАНОВЛЕНИИ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ ПАЦИЕНТОВ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ АНТИРЕТРОВИРУСНОЙ ТЕРАПИИ

Сайдакова Е. В.<sup>1</sup>, Шмагель Н. Г.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН; <sup>2</sup>Пермский краевой центр по борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями, Пермь, Россия

Исследованы концентрации гомеостатических цитокинов в плазме крови и количество Т-лимфоцитов, несущих клеточный рецептор к IL-7, у ВИЧ-инфицированных пациентов с различной эффективностью восстановления иммунной системы при проведении антиретровирусной терапии. Показано, что у больных с неэффективным ответом на лечение по сравнению с людьми, дающими адекватный ответ на терапию, снижено содержание IL-2, IL-7, а также количество CD4<sup>+</sup>CD127<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>CD127<sup>+</sup> Т-клеток. Эти данные позволяют заключить, что дефицит цитокинов, направленных на пролиферацию Т-лимфоцитов, и уменьшение числа клеток, способных отвечать на действие IL-7, могут определять низкую способность к реставрации иммунной системы у ВИЧ-инфицированных пациентов с дискордантным ответом на АРТ.

*Ключевые слова:* ВИЧ-инфекция, АРТ, IL-2, IL-7.

**Актуальность и цель работы.** Результатом антиретровирусной терапии (АРТ) являются снижение уровня репликации ВИЧ и увеличение абсолютного количества периферических CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов. Однако у части больных, получающих АРТ, не происходит восстановление иммунной системы несмотря на эффективное снижение вирусной нагрузки – так называемый «дискордантный ответ на терапию». Ранее было показано, что у таких пациентов наблюдается функциональное истощение Т-лимфоцитов [1]. Это состояние реализуется в снижении пролиферативной активности клеток и уменьшении продукции цитокинов. В то же время один из важных

механизмов реставрации иммунной системы – гомеостатическая пролиферация клеток – зависит от присутствия достаточного количества ряда цитокинов, продуцируемых Т-лимфоцитами.

**Целью** настоящей работы было исследовать концентрации гомеостатических цитокинов IL-7 и IL-2 в крови ВИЧ-инфицированных пациентов с различной эффективностью ответа иммунной системы на антиретровирусную терапию.

**Материалы и методы.** План работы был одобрен этическим комитетом Пермского краевого центра по борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями (IRB00008964).

Каждый пациент дал письменное информированное согласие на участие в исследовании. Всего было обследовано 100 человек. В зависимости от наличия ВИЧ-инфекции и темпов роста уровня CD4<sup>+</sup> Т-клеток в ответ на лечение все обследованные были разделены на три группы: 1 – ВИЧ<sup>+</sup> пациенты с числом CD4<sup>+</sup> Т-клеток крови менее 350/мкл (n=38; дискордантный ответ на терапию – ДОТ); 2 – ВИЧ<sup>+</sup> больные с числом CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов более 350/мкл (n=42; стандартный ответ на терапию – СОТ); 3 – относительно здоровые добровольцы без признаков ВИЧ-инфекции (n=20; контроль – К).

Все ВИЧ-инфицированные пациенты до начала АРТ имели уровень CD4<sup>+</sup> Т-клеток в крови менее 200/мкл, находились на терапии не менее двух лет, и к моменту обследования репликация ВИЧ у них была полностью подавлена (<50 копий/мл крови).

В крови каждого участника исследования устанавливали вирусную нагрузку ВИЧ, количество лейкоцитов и лимфоцитов, численность CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов. Мононуклеары крови получали путем центрифугирования в градиенте плотности диаколла ( $\rho=1,077$ ) стандартным методом. Определение концентраций IL-2 и IL-7 в плазме крови проводили методом иммуноферментного анализа. Цитофлуориметрический анализ клеток проводили на приборе Becton Dickinson LSR II с использованием моноклональных антител анти-CD3-PerCP, анти-CD4-AF700, анти-CD8-PE-CF594 (Becton Dickinson, США), анти-CD127-PE-Cy7 (Biolegend, США), и витального красителя LIVE/DEAD® Fixable Yellow Dead Cell Stain Kit (Invitrogen, США).

Статистическую обработку результатов проводили методами параметрического и непараметрического анализов. При анализе данных о клетках рассчитывали медиану, а сравнение величин проводили с использованием U-критерия Манна-Уитни. При оценке уровней цитокинов данные логарифмировали. В выборках определяли среднюю арифметическую и ее ошибку. Сравнение средних величин проводили по *t*-критерию Стьюдента.

**Результаты.** Мужчины составили 55,3% группы ДОТ. Средний возраст пациентов был равен 35,5 годам. Путь передачи ВИЧ-инфекции был преимущественно парентеральным (55,3%). Группа СОТ была представлена преимущественно женщинами (66,7%).

Средний возраст пациентов составил 33,5 года. В группе преобладал половой путь передачи ВИЧ-инфекции (57,1%). В группе К женщины составили 60% пациентов. Средний возраст участников был равен 30,5 годам. Все обследованные люди не имели статистически достоверных отличий по возрасту, продолжительности ВИЧ-инфекции и времени применения антиретровирусных препаратов.

Ранее мы обнаружили повышенную экспрессию PD-1 на Т-клетках ВИЧ-инфицированных больных с дискордантным ответом на АРТ [1]. Известно, что PD-1-позитивные Т-клетки отличаются сниженной пролиферативной активностью и слабой способностью синтезировать цитокины [2, 3]. В связи с этим мы провели сравнение уровней продукции гомеостатических цитокинов IL-2 и IL-7 у ВИЧ-инфицированных больных с нарушением восстановления иммунитета и субъектов, адекватно отвечающих на терапию.

Полученные данные свидетельствуют о том, что концентрация IL-7 в плазме крови ВИЧ-инфицированных пациентов с дискордантным ответом Т-лимфоцитов на АРТ достоверно ниже соответствующих показателей в группе ВИЧ-инфицированных больных со стандартной реакцией на лечение ( $P<0,001$ ) и в контрольной группе ( $P<0,001$ ). Похожая ситуация была отмечена при анализе концентрации IL-2 ( $P<0,05$  при сравнении группы ДОТ с группами СОТ и К).

Кроме того, нами было показано снижение относительной и абсолютной численности CD4<sup>+</sup> Т-клеток, а также абсолютного количества CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, несущих  $\alpha$ -цепь поверхностного рецептора к IL-7 (CD127), у пациентов, неспособных к эффективному ответу на лечение. Количество CD4<sup>+</sup>CD127<sup>+</sup> Т-лимфоцитов составило 210/мкл и 410/мкл в группах ДОТ и СОТ соответственно ( $P<0,001$ ). Количество CD8<sup>+</sup>CD127<sup>+</sup> Т-клеток было равно 272/мкл и 332/мкл в группах ДОТ и СОТ соответственно ( $P<0,01$ ). А процентное содержание CD4<sup>+</sup>CD127<sup>+</sup> Т-лимфоцитов составило 79,9% и 87,5% в группах ДОТ и СОТ соответственно ( $P<0,01$ ). Следует отметить, что ранее Hodge и соавторы [4] продемонстрировали, что восстановление числа CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток у ВИЧ-инфицированных больных, эффективно отвечающих на лечение, происходит за счет деления именно CD127<sup>+</sup> Т-лимфоцитов. Эти данные позволяют заклю-



чить, что дефицит цитокинов, направленных на пролиферацию Т-лимфоцитов, а также уменьшение числа клеток, способных отвечать на действие IL-7, могут определять низкую способность к восстановлению количества Т-лимфоцитов у ВИЧ-инфицированных пациентов с дискордантным ответом на АРТ.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Сайдакова Е. В., Шмагель Н. Г. Российский иммунологический журнал. Т. 8, № 3. С.868-870.
2. Day C. L., Kaufmann D. E., Kiepiela P. et al. Nature 2006; 443:350-354.
3. Trautmann L., Janbazian L., Chomont N. et al. Nat Med. 2006; 12:1198-1202.
4. Hodge J. N., Srinivasula S., Hu Z. et al. Blood 2011; 118 (12):3244-3253.

### ROLE OF HOMEOSTATIC CYTOKINES IL-2 AND IL-7 IN THE INEFFICIENT IMMUNE RESTAURATION IN HIV-INFECTED PATIENTS DURING ANTIRETROVIRAL THERAPY

Saidakova E. V.<sup>1</sup>, Shmagel N. G.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms; <sup>2</sup>Perm Regional Center  
for Protection against AIDS and Infectious Diseases, Perm, Russia

Homeostatic cytokines and T cells bearing IL-7 receptor in HIV-infected patients with different antiretroviral-mediated immune restoration efficiency were studied. A reduced content of IL-2 and IL-7, and the reduced CD4<sup>+</sup>CD127<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup>CD127<sup>+</sup> T cell counts in patients with poor response to the treatment were shown. These data propose the lack of homeostatic cytokines and the decrease in the number of cells capable of responding to IL-7 being a reason for the poor immune system restoration in HIV-infected patients with discordant response to ART.

---

---

### РОЛЬ ИНТЕРФЕРОНА-ГАММА В МЕЖКЛЕТОЧНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯХ ПРИ *HELICOBACTER PYLORI*-ИНФЕКЦИИ

Саранчина Ю. В., Быкова Т. В., Дихтяров Д. С.,  
Ауходеев Д. Р.

ФГБОУ ВПО «Хакасский государственный университет им. Н. Ф. Катанова»,  
Абакан, Россия

**Цель исследования:** оценка содержания ИФН- $\gamma$  в сыворотке крови при НР-ассоциированном хроническом гастрите. **Материалы методы.** Венозная кровь 139 человек в возрасте от 25 до 56 лет с хроническим гастритом и без. Титр специфических антител и уровень ИФН- $\gamma$  определяли методом ИФА-анализа. **Результаты исследования.** Содержание ИФН- $\gamma$  в сыворотке крови было статистически значимо ниже у больных с ХГ как с наличием специфических антител IgG к антигену CagA НР, так и при ХГ, не ассоциированным с НР-инфекцией по сравнению с условно здоровыми донорами и бессимптомным носительством НР-инфекции. Независимо от титра антител уровень ИФН- $\gamma$  был выше в группе с бессимптомным носительством НР-инфекции по сравнению с больными с НР-ассоциированным ХГ. **Выводы.** Длительная стимуляция НР-инфекции при ХГ приводит к истощению продукции ИФН- $\gamma$ .

**Ключевые слова:** *Helicobacter pylori*, интерферон- $\gamma$ , хронический гастрит.

**Введение.** *Helicobacter pylori* (НР) является (ХГ) и язвенной болезни желудка. В настоящее время причиной развития хронического гастрита бактерией НР инфицировано более 3

млрд. жителей Земли. Длительная персистенция НР может привести к атрофии слизистой, что рассматривается как предраковое состояние в каскаде Кореа (Цуканов В. В., 2014). Однако, не у всех инфицированных развивается НР-ассоциированная гастродуоденальная патология. Известно, что в основе развития НР-заболеваний играют роль не только факторы патогенности бактерии, но и состояние иммунного статуса организма, а также генетическая предрасположенность к продукции цитокинов (Агеева Е. С., 2011). Исследование цитокинового профиля является важным показателем оценки состояния иммунной системы при заболеваниях различного генеза, в том числе и при НР-инфекции. Ключевым цитокином как естественного, так и адаптивного иммунитета является интерферон- $\gamma$  (ИФН- $\gamma$ ). Он осуществляет иммунологический надзор и защищает организм от патогенных микроорганизмов, а также регулирует опухолевый рост. Нарушение продукции этого цитокина снижает резистентность организма, способствуя развитию инфекционных заболеваний и опухолевого роста (Симбирцев А. С., 2004). Таким образом, изучение роли ИФН- $\gamma$  и степени его продукции в иммунопатогенезе НР-инфекции представляется актуальным. В связи с чем, целью исследования является оценка уровня содержания ИФН- $\gamma$  в сыворотке крови при НР-ассоциированном ХГ.

**Материалы и методы исследования.** В качестве материала использовалась венозная кровь, полученная у 139 человек мужчин и женщин в возрасте от 25 до 56 лет. Все обследуемые подписали информированное согласие на проведение исследования. Всем обследуемым было проведено определение титра специфических антител к антигену CagA НР и уровня ИФН- $\gamma$  методом твердофазного ИФА-анализа («Вектор-Бест», г. Новосибирск). На основании полученных результатов было сформировано 4 группы обследуемых: 1 группа – условно здоровые доноры, не имеющие специфических антител к НР (19 чел.); 2 группа – бессимптомное носительство инфекции НР, имеющие специфические антитела (12 чел.); 3 группа – больные ХГ, не имеющие специфических антител (74 чел.); 4 группа – больные ХГ, имеющие специфические антитела (34 чел.). Статистическую обработку результатов проводили с помощью пакета программ «IBM SPSS Statistics 19». Достоверность различий определяли с помощью

критерия Манна-Уитни. Результаты представлены в виде Me (С25–С75). Критическое значение уровня значимости принималось равным 5%.

**Результаты исследования.** Содержание ИФН- $\gamma$  в сыворотке крови было статистически значимо ниже у больных с ХГ как с наличием специфических антител IgG к антигену CagA НР, так и при ХГ, не ассоциированным с НР-инфекцией по сравнению с условно здоровыми донорами и бессимптомным носительством НР-инфекции. Достоверных различий между концентрацией ИФН- $\gamma$  в группах с бессимптомным носительством НР и условно здоровых доноров выявлено не было и составило 21,2 (16,8–25,8) пкг/мл и 21,8 (17,8–26,5) пкг/мл соответственно. Содержание цитокина у больных с ХГ, ассоциированным с НР-инфекцией было выше (14,3 (13,4–15,7) пкг/мл), чем у больных с ХГ без инфекции (7,4 (0–13,9) пкг/мл). Для оценки влияния обсемененности НР на продукцию ИФН- $\gamma$  иммунокомпетентными клетками было проведено определение уровня цитокина при разных титрах антител к антигену CagA НР. В группе обследуемых с бессимптомным носительством НР-инфекции при титре антител в пределах 1:5–1:10 уровень ИФН- $\gamma$  составил 25,6 (20,7–25,9) пкг/мл, что было выше, чем при титре антител 1:20–1:40 [16,5 (11,6–26,1) пкг/мл] и наибольшем титре 1:80 [20,4 (18,1–30,7) пкг/мл]. Следовательно, чем выше титр специфических антител к антигену НР, тем ниже уровень ИФН- $\gamma$ . Концентрация ИФН- $\gamma$  в сыворотке крови у больных с НР-ассоциированным ХГ статистически значимо уменьшалась по сравнению с данным показателем в группе с отсутствием клинических симптомов независимо от уровня специфических антител. Так, при концентрации IgG 1:5–1:10 уровень ИФН- $\gamma$  составил 14,9 (13,8–15,9) пкг/мл; при титре 1:20–1:40–14,3 (12,6–15,1) пкг/мл; при титре 1:80–14,3 (13,1–16,2) пкг/мл. Полученные результаты могут быть интерпретированы следующим образом. Повышение уровня продукции ИФН- $\gamma$  мононуклеарами периферической крови у больных с НР-ассоциированным ХГ по сравнению с больными без бактериальной инфекции является отражением универсальной реакции иммунной системы на инфекционный агент. Роль ИФН- $\gamma$  связана с активирующим влиянием на фагоцитарную активность макрофагов, прямую цитотоксичность Т-лимфоцитов (Ни-

кулина Е. Л., 2010). Но, несмотря на повышенный уровень ИФН- $\gamma$  при НР-ассоциированном ХГ он ниже по сравнению с условно-здоровыми донорами. Вероятно, это может быть обусловлено истощением резервных возможностей клеток-продуцентов в результате длительной антигенной стимуляции, что приводит к снижению резистентности организма и усилению аллергического компонента в иммунных реакциях (Симбирцев А. С., 2004). Также это может быть связано со снижением количества клеток-продуцентов в результате реализуемого НР апоптоза. Возможно, у больных с НР-инфекцией происходит снижение чувствительности рецепторов или их блокирование антигеном или иммунными комплексами, что препятствует активации эффекторных клеток. Снижение ИФН- $\gamma$  может наблюдаться как в связи с выработкой ИФН- $\gamma$  в ответ на внедрение возбудителя, так и с расходом его в процессе развития иммунных нарушений (Симаненков В. И., 2005). Однако, тот факт, что при бессимптомном носительстве НР уровень ИФН- $\gamma$  выше, чем при хроническом гастрите, вероятно, свидетельствует о реализации его

защитных механизмов. Возможно, бессимптомное носительство НР-инфекции может быть связано с генетическими особенностями макроорганизма. Таким образом, содержание ИФН- $\gamma$  зависит от тяжести патологического процесса и активности воспаления. Длительная стимуляция персистирующим агентом приводит к истощению продукции ИФН- $\gamma$ . Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки России в рамках базовой части государственного задания.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Агеева Е. С., Штыгашева О. В., Рязанцева Н. В. Терапевтический архив, 2011; 2: 16-19.
2. Никулина Е. Л., Наследникова И. О., Уразова О. И. и др. Медицинская иммунология. 2010; 3: 259-264.
3. Симаненков В. И., Мазуров В. И., Раймуев К. В., и др. Эфферентная терапия. 2005; 1: 22-29.
4. Симбирцев А. С. Цитокины и воспаление. 2004; 3 (2): 16-24.
5. Цуканов В. В., Штыгашева О. В., Васютин А. В. и др. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2014; 10: 427-429.

## ROLE OF INTERFERON-GAMMA IN INTERCELLULAR INTERACTIONS IN *HELICOBACTER PYLORI* INFECTION

Saranchina Yu.V., Bykova T. V., Dikhtyarov D. S., Aukhodeev D. R.

Federal State-Funded Educational Institution of Higher Professional Education  
«Katanov Khakass State University», Abakan, Russia

The aim of the study: evaluation of the levels of IFN- $\gamma$  in the serum with HP-associated chronic gastritis (CG). Materials and methods. Venous blood 139 people aged 25 to 56 years with CG with or without. The titer of specific antibodies and the level of IFN- $\gamma$  was determined by ELISA analysis. The results of the study. The content of IFN- $\gamma$  in serum was statistically significantly lower in patients with CG with the presence of specific IgG antibodies to the CagA antigen of HP and CG are not associated with HP infection compared to healthy donors and asymptomatic carriage of HP infection. Regardless of the titer of antibodies level of IFN- $\gamma$  was higher in the group with asymptomatic carriage of HP infection compared with patients with HP-associated CG. Conclusions. Long-term stimulation of HP infection with CG leads to the depletion of the production of IFN- $\gamma$ .

*Keywords:* *Helicobacter pylori*, interferon- $\gamma$ , chronic gastritis.

## РОЛЬ РЕВМАТОИДНОГО ФАКТОРА В ГИБЕЛИ CD4<sup>+</sup> ЛИМФОЦИТОВ У КРЫС, ИММУНИЗИРОВАННЫХ GP120 ГЛИКОПРОТЕИНОМ ВИЧ-1

Храмова Т. В., Бедулева Л. В., Березкина С. Ю.,  
Меньшиков И. В.

ФГБОУ ВПО «Удмуртский государственный университет»,  
Ижевск, Россия

Известно, что развитие иммунодефицита при ВИЧ инфекции является результатом истощения CD4<sup>+</sup> лимфоцитов. Не смотря на то, что прямое цитопатическое влияние ВИЧ на CD4<sup>+</sup> клетки вносит вклад в их истощение, большинство из гибнущих при ВИЧ инфекции лимфоцитов не инфицированы ВИЧ. Механизм гибели неинфицированных CD4<sup>+</sup> лимфоцитов не ясен. Целью работы было выяснение роли аутоиммунной реакции в гибели CD4<sup>+</sup> лимфоцитов на модели иммунизации крыс gp120 гликопротеином ВИЧ-1. Обнаружено, что гибель CD4<sup>+</sup> лимфоцитов у крыс, иммунизированных gp120, является результатом совместного действия аутоантител к CD4 и ревматоидного фактора.

*Ключевые слова:* gp120, вирус иммунодефицита человека, ревматоидный фактор.

Известно, что развитие иммунодефицита при ВИЧ инфекции является результатом истощения CD4<sup>+</sup> лимфоцитов. Несмотря на то, что прямое цитопатическое влияние ВИЧ на CD4<sup>+</sup> клетки вносит вклад в их истощение, большинство из гибнущих при ВИЧ инфекции лимфоцитов не инфицированы ВИЧ. Почему гибнут неинфицированные CD4<sup>+</sup> лимфоциты сегодня не известно. Получено много фактов, демонстрирующих, что незараженные CD4<sup>+</sup> лимфоциты при ВИЧ-инфекции гибнут по механизму апоптоза, чувствительность лимфоцитов к апоптозу коррелирует с прогрессированием болезни. Рассматривают несколько причин апоптоза неинфицированных CD4<sup>+</sup> клеток при ВИЧ-инфекции. Наиболее обоснованной является гипотеза активационно-индуцированной смерти незараженных CD4<sup>+</sup> лимфоцитов. Согласно данной гипотезе незараженные CD4<sup>+</sup> лимфоциты подвергаются генерализованной активации и приобретают чувствительность к апоптозу. Впоследствии активированные клетки, встречаясь с индуктором апоптоза, подвергаются апоптозу. Однако фактор генерализованной активации незараженных CD4<sup>+</sup> лимфоцитов, а также индуктор апоптоза, т.е. фактор, убивающий активированные CD4<sup>+</sup> лимфоциты, остаются не известны.

Хроническую поликлональную активацию незараженных CD4<sup>+</sup> лимфоцитов при ВИЧ инфекции могут вызывать аутоантитела к CD4. Гипотеза, рассматривающая ведущую роль аутоиммунной реакции к CD4 в патогенезе СПИДа, впервые предложена Kennedy, в 1992 г. [5]. Keay и Coore показали наличие идиотип-антиидиотипических взаимодействий между антителами к gp120 и аутоантителами к CD4 у ВИЧ-инфицированных людей [3,4], в результате чего стал ясен механизм образования аутоантител к CD4 при ВИЧ инфекции. Gp120, активируя анти-gp120 лимфоциты, запускает также активацию связанных с ними в идиотип-антиидиотипических взаимодействиях аутореактивных анти-CD4<sup>+</sup> лимфоцитов. Гипотеза получила многочисленные экспериментальные подтверждения [1], однако не стала общепринятой, так как не у всех ВИЧ-инфицированных удалось выявить в плазме крови антитела к CD4.

Чтобы выяснить роль аутоиммунной реакции к CD4 в гибели CD4<sup>+</sup> лимфоцитов мы проиммунизировали крыс Wistar рекомбинантным gp120 гликопротеином ВИЧ однократно в дозе 20 мкг на животное внутрикожно в составе неполного адъюванта Фрейнда (НАФ). Контрольные крысы получили инъекцию НАФ. У животных ежене-

дельно забирали кровь. В плазме крови определяли антитела к gp120 ВИЧ и аутоантитела к рекомбинантному CD4 крыс (R&D Systems) методом иммуноферментного анализа. Также определяли титр ревматоидного фактора (РФ) методом непрямой агглютинации танизированных нагруженных гомологичным IgG эритроцитов. Количество CD4<sup>+</sup> лимфоцитов в периферической крови крыс измеряли методом проточной цитофлуориметрии, используя моноклональные антитела к CD4 меченые ФИТЦ.

Иммунизация крыс Wistar gp120 ВИЧ вызвала продукцию не только антител к gp120 ВИЧ, но и аутоантител к CD4. Снижение CD4<sup>+</sup> лимфоцитов у крыс, иммунизированных gp120 ВИЧ, носило транзиторный скачкообразный характер. Тем не менее, среднее за период наблюдения значение количества CD4<sup>+</sup> лимфоцитов у крыс, иммунизированных gp120 ВИЧ ( $1278 \pm 817$  клеток в мкл), достоверно ниже ( $p < 0,05$ ) среднего уровня CD4<sup>+</sup> лимфоцитов в периферической крови контрольных крыс ( $1778 \pm 742$  клеток в мкл). Вопреки ожиданиям непосредственной связи между уровнем аутоантител к CD4 и количеством CD4<sup>+</sup> лимфоцитов в крови не выявлено. В то же время мы заметили, что снижение количества CD4<sup>+</sup> лимфоцитов в крови крыс совпадает со спонтанным повышением уровня ревматоидного фактора в крови. РФ был исследован у крыс, иммунизированных gp120, с целью выяснения его роли в регуляции иммунного ответа к gp120, так как ранее на нескольких экспериментальных моделях было показано его участие в предотвращении развития аутоиммунных заболеваний [2]. Сравнительный анализ количества CD4<sup>+</sup> лимфоцитов у крыс с относительно высоким уровнем РФ (титр  $> 1:16$ ) ( $920 \pm 366$  клеток в мкл крови) и крыс с относительно низким уровнем РФ (титр  $\leq 1:16$ ) ( $1524 \pm 953$  клеток в мкл крови), выявил достоверно низкий уровень CD4<sup>+</sup> клеток у крыс с высоким уровнем РФ. Данная связь характерна только для крыс, иммунизированных gp120 и продуцирующих аутоантитела к CD4. У контрольных крыс количество CD4<sup>+</sup> клеток не зависит от содержания РФ в крови (при титре РФ  $> 1:16 - 1727 \pm 728$  клеток, при титре РФ  $\leq 1:16 - 1620 \pm 794$  клеток).

На основании полученных данных можно предполагать, что гибель CD4<sup>+</sup> лимфоцитов у крыс, иммунизированных gp120 – результат совместного действия аутоантител к CD4 и ревматоидного фактора.

Для проверки этого предположения был проведен эксперимент *in vitro*. Лимфоциты интактной крысы в течение 24 часов инкубировали с сывороткой, содержащей аутоантитела к CD4, полученной от крыс, иммунизированных gp120 ВИЧ. После завершения инкубации добавляли сыворотку, содержащую РФ. Через 3 часа подсчитывали количество живых и мертвых клеток в камере Горяева с использованием красителя трипанового синего. В результате обнаружили гибель 40% лимфоцитов, что достоверно ниже гибели лимфоцитов в случае добавления сыворотки, не содержащей РФ (количество погибших клеток составило 16,5%), или в случае инкубации с сывороткой, не содержащей антитела к CD4, где также добавляли РФ-содержащую сыворотку (количество погибших клеток – 5,3%).

Таким образом, иммунизация крыс Wistar gp120 гликопротеином ВИЧ вызывает развитие аутоиммунной реакции к CD4 и транзиторное снижение CD4<sup>+</sup> лимфоцитов на фоне высокого уровня ревматоидного фактора в крови. В эксперименте *in vitro* сыворотка, содержащая ревматоидный фактор, вызывает гибель лимфоцитов крыс, предварительно инкубированных с сывороткой, содержащей аутоантитела к CD4. Данные факты свидетельствуют о том, что гибель CD4<sup>+</sup> лимфоцитов у крыс, иммунизированных gp120, является результатом совместного действия аутоантител к CD4 и ревматоидного фактора.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Heeney J, Jonker R, Koornstra W, et al. // J. Med. Primatol. 1993. Vol. 22. P. 194-200.
2. Beduleva L., Menshikov I., Stolyarova E. // Int. J. Rheum. Dis. 2014. P. 1-13.
3. Corre J.P., Fevrier M., Chamaret S., et al. // Eur. J. Immunol. 1991. Vol. 21. P. 743-751.
4. Keay S., Weckslar W., Wasserman S. // J. Infect. Dis. 1995. Vol. 171. P. 312-319.
5. Kennedy J.R. // Med. Hypotheses. 1992. Vol. 37. P. 16-19.

**ROLE OF RHEUMATOID FACTOR IN THE DEATHS  
OF CD4<sup>+</sup> LYMPHOCYTES IN RATS IMMUNIZED WITH  
GP120 GLYCOPROTEIN OF HIV-1.**

**Khramova T. V., Beduleva L. V., Berezkina S. Yu., Menshikov I. V.**

*Udmurt State University, Izhevsk, Russia*

It is known that the development of immunodeficiency in HIV infection is the result of depletion of CD4<sup>+</sup> lymphocytes. The direct cytopathic effect of HIV contributes to the depletion of CD4 T cells, but uninfected CD4<sup>+</sup> cells mostly die in the course of HIV infection. The mechanism of destruction of uninfected CD4<sup>+</sup> lymphocytes is not clear. The aim was to elucidate the role of autoimmunity in the death of CD4<sup>+</sup> lymphocytes in the rat model of immunization with gp120 glycoprotein of HIV-1. It was found that the death of CD4<sup>+</sup> lymphocytes from rats immunized with gp120 is the result of the combined action of antibodies to CD4 and rheumatoid factor.

*Keywords:* gp120, human immunodeficiency virus, rheumatoid factor.

**Раздел 9**  
**ГЕНОМИКА ИММУНИТЕТА**

## РОЛЬ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА IL-1 $\beta$ ПРИ МЕТАБОЛИЧЕСКОМ СИНДРОМЕ У НАСЕЛЕНИЯ ХАКАСИИ

Агеева Е. С., Штыгашева О. В., Килина О. Ю.,  
Россова Н. А., Берсенёва О. А.

ФГБОУ ВПО «Хакасский государственный университет им. Н. Ф. Катанова»,  
Абакан, Россия

**Цель исследования:** установление роли полиморфизма гена IL-1 $\beta$  в иммунопатогенезе МС у населения Хакасии. **Материал и методы.** Исследование выполнено у 85 человек, из них 63 хакаса и 25 европеоидов. Анализ полиморфизма С+3953Т и -31 Т>С гена IL-1 $\beta$  провели полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. **Результаты исследования.** У хакасов риск развития МС связан с генотипом СТ +3953 IL-1 $\beta$  (OR=2,10), у хакасов с СС -31 Т>С IL-1 $\beta$  (OR=3,33). У хакасов ТС -31 Т>С IL-1 $\beta$  расценивается как протективный, (OR=0,32), у европеоидов - СС (OR=0,36) и повышен у носителей ТТ (OR=2,20). **Заключение.** Показано, что распределение генотипов полиморфизма С+3953Т и -31 Т>С гена IL-1 $\beta$  отличалось у хакасов и европеоидов. Различия характерны и для роли полиморфизма гена в риске развития МС.

**Ключевые слова:** метаболический синдром, полиморфизм генов, хакасы.

**Введение.** Метаболический синдром (МС) является одной из приоритетных проблем медицины и характеризуется широкой распространенностью (25–35%) среди населения развитых стран. МС в полной мере можно считать социально значимой проблемой, что, соответственно, требует разработки подходов к раннему выявлению групп риска и факторов предрасположенности к развитию данной патологии [1]. Большинство современных исследований демонстрируют явление популяционного диморфизма в распространенности компонентов МС, в том числе, это показано и на территории России на примере исследования популяции коренных жителей Якутии и Хакасии [2,3]. Фактором, объясняющим подобный феномен, может быть иммуногенетическая предрасположенность в реализации патогенеза заболеваний [4].

Таким образом, актуальным является раскрытие патогенетических механизмов формирования патологии, оценка экспрессии факторов риска, уточнение патогенетической роли эндотелия, окислительного стресса, воспаления.

**Целью** исследования являлось установление роли полиморфизма гена IL-1 $\beta$  в иммунопатогенезе МС у населения Хакасии.

**Материал и методы исследования.** Исследование выполнено у 85 человек, из них 63 хакаса и 25 европеоидов. Средний возраст - 49,9 $\pm$ 12,3 лет. Обследованный контингент представлен двумя популяциями: хакасы (монголоиды или коренные жители) и европеоиды (пришлые жители).

МС верифицировали согласно классификации ВОЗ (2008) с применением критериев Международной Федерации Диабета (2005). Ожирение расценивалось как абдоминальное при соотношении ОТ/ОБ свыше 0,85 у женщин и 1,0 у мужчин. Избыточную массу тела (ИМТ) и ожирение верифицировали согласно индексу Кетле. Нарушенную гликемию натощак устанавливали при уровне глюкозы натощак от 5,6 до 6,1 ммоль/л, и гликемии <7,8 ммоль/л через 2 часа после проведения глюкозотолерантного теста. Общее лабораторное исследование включало биохимический анализ крови (сахар, общий холестерин, триглицериды, холестерин липопротеидов высокой и низкой



плотности, расчет индекса атерогенности, мочевины, креатинин, мочевиная кислота). Анализ полиморфизма С+3953Т и -31 Т>С гена IL-1 $\beta$  выполняли полимеразной цепной реакцией (ПЦР) с детекцией результатов в режиме реального времени (ДТпрайм2000 «НПО ДНК-Технология»). Статистический анализ осуществляли с использованием программы Statistica 8.0. При описании генетических характеристик использовали критерий  $\chi^2$  Мантла-Ханзела, критерий отношения шансов (OR) при 95% доверительном интервале (CI).

**Результаты исследования.** Показано, что у хакасов в группе здоровых доноров наиболее частым генотипом был СС полиморфизма С+3953Т гена IL-1 $\beta$  – 72%, доля СТ составила 28%. Аналогичная тенденция сохранялась и в группе пациентов с МС (55 и 45%,  $\chi^2=6,20$ ;  $p=0,01$ ). Доминирующими являлись гомозиготы СС (у пациентов с МС – 71%, в группе здоровых доноров – 70%). Доля гетерозигот СТ была ниже у пациентов с МС, по сравнению с контролем (18 и 30%, соответственно,  $\chi^2=3,93$ ;  $p=0,004$ ). Генотип ТТ был выявлен только у пациентов с МС (11%). При сравнительном анализе частоты встречаемости генотипов у хакасов, страдающих МС, и европеоидов с МС было выявлено, что генотип СС был достоверно чаще у европеоидов, чем у хакасов ( $\chi^2=3,78$ ;  $p=0,001$ ), в то время как СТ – соответственно ниже ( $\chi^2=5,78$ ;  $p=0,0002$ ). Установлено, что у хакасов возможное влияние на риск развития МС связано с наличием генотипа СТ +3953 IL-1 $\beta$  (OR=2,10 при 95% CI 1,13–3,96).

Анализ полиморфизма -31 Т>С IL-1 $\beta$  показал, что у здоровых доноров, хакасов и европеоидов, наиболее распространены генотип ТС IL-1 $\beta$  (54 и 70%, соответственно). Однако частота ТС у хакасов была ниже, чем у европеоидов ( $\chi^2=5,41$ ;  $p=0,02$ ). Гомозиготы ТТ IL-1 $\beta$  статистически значимо чаще встречались у хакасов по сравнению с европеоидами,  $\chi^2=7,19$ ;  $p=0,007$ . У хакасов генотип ТС встречался реже у больных с МС, чем в группе контроля (27 и 54%, соответственно,  $\chi^2=15,1$ ;  $p=0,0001$ ). Гомозиготы СС -31 Т>С гена IL-1 $\beta$  у больных МС встречались чаще по сравнению с группой здоровых доноров (37 и 15%, соответственно,  $\chi^2=12,5$ ;  $p=0,0004$ ). Гомозиготы ТТ полиморфизма -31 Т>С гена IL-1 $\beta$  встречались в сравниваемых группах одинаково ча-

сто (23% при МС и 31% – в группе здоровых доноров,  $p=0,37$ ).

У европеоидов доля ТС не отличалась при МС относительно группы здоровых доноров (67 и 70%, соответственно). Доля СС была ниже у пациентов с МС (6%), чем у здоровых доноров (15%,  $\chi^2=4,29$ ;  $p=0,038$ ). В то время как генотип ТТ был выше при МС (28 и 15%,  $\chi^2=4,98$ ;  $p=0,025$ ).

Генотип ТС в 2,5 раза чаще встречался у европеоидов ( $\chi^2=31,9$ ;  $p=0,0001$ ), чем у хакасов, а генотип СС в более чем 6 раз чаще встречался у коренных жителей ( $\chi^2=28,3$ ;  $p=0,001$ ). У хакасов риск развития МС ассоциирован с СС -31 Т>С гена IL-1 $\beta$  (OR=3,33 при 95% CI 1,6–6,9). Генотип ТС -31 Т>С гена IL-1 $\beta$  в данной группе расценивается нами как протективный, на основании рассчитанного значения критерия отношения шансов (OR=0,32 при 95% CI 0,2–0,6). У европеоидов риск развития МС может быть снижен у носителей генотипа СС (OR=0,36 при 95% CI 0,1–1,1) и повышен у носителей ТТ (OR=2,20 при 95% CI 1,0–4,7).

**Заключение.** Таким образом, в результате исследования показано, что характер распределения генотипов полиморфизма С+3953Т и -31 Т>С гена IL-1 $\beta$  отличался как у хакасов, так и у европеоидов. Различия также были характерны и для роли полиморфизма гена в риске развития МС. У хакасов риск развития МС связан с наличием генотипа СТ +3953 IL-1 $\beta$  (OR=2,10) и СС -31 Т>С гена IL-1 $\beta$  (OR=3,33). Генотип ТС -31 Т>С гена IL-1 $\beta$  у хакасов ассоциирован со снижением риска развития МС (OR=0,32). У европеоидов риск развития МС может быть снижен у носителей генотипа СС ТС -31 Т>С гена IL-1 $\beta$  (OR=0,36) и повышен у носителей ТТ (OR=2,20).

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки России в рамках базовой части государственного задания.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дедов И.И., Бутрова С.А., Дзгоева Ф.Х. Ожирение и метаболизм. 2004; 2: 19-24.
2. Гинсар Е.А., Селятицкая В.Г., Лутов Ю.В. и др. Профилактическая медицина. 2010; 1: 37-41.
3. Россова Н.А., Саранчина Ю.В., Берсенёва О.А. и др. Российский иммунологический журнал. 2014; 8 (17) 3: 378-380.
4. Агеева Е.С., Штыгашева О.В., Рязанцева Н.В. Терапевтический архив. 2011; 83 (2): 16-19.

## THE ROLE OF POLYMORPHISM OF GENES IL-1B AT THE METABOLIC SYNDROME FROM PATIENTS OF KHAKASSIA

Ageeva E. S., Shtygasheva O. V., Kilina O. Yu., Rossova N. A., Bersenyova O. A.

*Federal State-Funded Educational Institution of Higher Professional Education  
«Katanov Khakass State University», Abakan, Russia*

The aim of the study: to determine the role polymorphism of genes IL-1 $\beta$  at the immunopathogenesis of the metabolic syndrome from patients of Khakassia. Materials and methods: A total of 85 people: men and women, from them 63 Khakas and 25 Caucasians. The analysis of polymorphism of C+3953T and -31 T>C; the C gene of IL-1 $\beta$  by polimerazny chain reaction with detection of results in real time. The results of the study. At Khakas possible influence on risk of development of metabolic syndrome is connected with existence of a genotype of CT +3953 IL-1 $\beta$  (OR=2,10), at Khakas – CC – T>C IL-1 $\beta$  (OR=3,33). The genotype of the TC -31 T>C of a gene of IL-1 $\beta$  in this group is regarded by protective (OR=0,32), at Caucasians – (OR=0,36) and is increased at TT carriers (OR=2,20). Conclusions: Shown that nature of distribution of genotypes of polymorphism of C+3953T and -31 T>C gene of IL-1 $\beta$  differed both at Khakas and at Caucasians. Distinctions were also characteristic and the role of polymorphism of a gene in risk of development of metabolic syndrome.

## ХАРАКТЕРИСТИКА ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТИ РИСКА РАЗВИТИЯ ГАСТРОЭЗОФАГЕАЛЬНО РЕФЛЮКСНОЙ БОЛЕЗНИ У ХАКАСОВ

Агеева Е. С., Манонина М. Б., Таранова А. А., Буторин Н. Н.

*ФГБОУ ВПО «Хакасский государственный университет им. Н. Ф. Катанова»,  
Абакан, Россия*

**Целью** исследования являлось установление роли полиморфизма гена IL-1 $\beta$  при ГЭРБ у хакасов. **Материал и методы исследования.** Обследовано 204 человека коренного населения. В основную группу были включены 34 больных ГЭРБ. Исследовали полиморфизм C +3953T IL-1 $\beta$ , IL-1Ra VNTR, -174 G>C IL-6 и T-251A IL-8 генов методом рестриционного анализа продуктов амплификации специфических участков генома. Анализ ассоциации полиморфизмов с ГЭРБ – с помощью критерия отношения шансов (OR с 95% доверительным интервалом (CI). **Результаты исследования.** Обнаружено, что основным генотипом у хакасов был CC +3953 IL-1 $\beta$  (81%) и R4R4 IL-1Ra VNTR (80,0%), CC (22,0%) и гомозигот GG (78,0%) -174 G>C IL-6, TT -251A IL-8 (50%). **Заключение.** Таким образом, анализируя характер распределения полиморфизма генов у пациентов с ГЭРБ, выявлены следующие доминирующие генотипы: CC полиморфизма C+3953T гена IL-1 $\beta$ , R4R4 гена IL-1Ra VNTR, GG полиморфизма -174 G>C гена IL-6, TT T-251A IL-8. Возможный риск развития ГЭРБ у хакасов может быть ассоциирован с генотипом CC полиморфизма C+3953T гена IL-1 $\beta$ .

**Ключевые слова:** ГЭРБ, полиморфизм генов, хакасы.

Гастроэзофагеальная рефлюксная болезнь (ГЭРБ) – одно из наиболее распространенных заболеваний пищеварительной системы, имеет длительное, рецидивирующее течение и остается актуальной проблемой современной га-

строэнтерологии (Цуканов В. В., 2014). По современным представлениям, формирование ГЭРБ определяется действием многих факторов, в том числе и нарушением моторики пищевода и желудка. Однако, несмотря на мульт-

тифакторную природу, ГЭРБ в большей мере является кислотозависимым заболеванием.

Общепризнанно, что течение и прогноз хронических воспалительных процессов и предраковых заболеваний пищеварительного тракта в значительной степени определяется состоянием иммунного статуса организма.

Интерлейкины являются неотъемлемыми участниками иммунных реакций. С их помощью осуществляются иммунные реакции, направленные на элиминацию инфекционного агента, поврежденных структур и восстановление постоянства внутренней среды. Цитокины контролируют рост, дифференцировку и функциональную активность клеток различной тканевой принадлежности. Различные цитокины, влияя на процессы дифференцировки и апоптоза эпителия, регулируя процессы секреции и моторики ЖКТ, принимают участие в развитии заболеваний пищеварительной системы и в качестве повреждающих, и в качестве защитных факторов (Агеева Е. С., 2010). До настоящего времени многие аспекты патогенеза ГЭРБ остаются окончательно не ясными, ранняя диагностика и прогнозирование течения ГЭРБ остаются сложными задачами для клиницистов. Генетическая составляющая заболеваний может быть ассоциирована с аллельными вариантами определенных провоспалительных цитокинов, таких как: *IL-1 $\beta$* , *IL-1Ra*, *IL-6*, *IL-8*. Полиморфные варианты генов характеризуются разным уровнем экспрессии соответствующего гена, тем самым способны детерминировать выраженность регулируемых ими реакций (Hollegaard M. V., 2006, Mclean M. H., 2010).

Целью исследования являлось установление роли полиморфизма генов при ГЭРБ у хакасов.

**Материал и методы исследования.** Обследовано 204 человека коренного населения Республики Хакасия – хакасов. В основную группу были включены 34 больных ГЭРБ (11 мужчин, 23 женщин), 44,3 $\pm$ 9,3 года. Группа сравнения была представлена условно здоровыми донорами из 170 человек, с аналогичными характеристиками по полу и возрасту. Диагноз ГЭРБ основывался на основании рекомендации Монреальского консенсуса. Степень повреждения слизистой оболочки пищевода оценивали по Лос-Анджелесской классификации. Исследование полиморфизма генов *C +3953T IL-1 $\beta$* , *-174 G>C IL-6* и *T-251A IL-8* осуществляли методом рестрикционного анализа продук-

тов амплификации специфических участков генома. Исследование *IL-1Ra VNTR* проводили ПЦР – 86 п.н. (Агеева Е. С., 2011). Статистический анализ проводился с использованием программы Statistica 8.0. Для сравнения частот аллелей использовали критерий  $\chi^2$  с поправкой Йейтса на непрерывность. Анализ ассоциации полиморфизмов с ГЭРБ – с помощью критерия отношения шансов (OR при 95% CI).

**Результаты исследования.** Основным доминирующим генотипом во всех группах хакасов, был вариант *CC*, доля которого у больных ГЭРБ составила 81%, в группе сравнения – 68% ( $\chi^2=4,45$ ,  $p=0,035$ ). Вторым по частоте встречаемости были гетерозиготы *CT* (19% в группе с ГЭРБ, и 27% в группе сравнения). Учитывая значение критерия отношения шансов, можно достоверно предполагать о связи генотипа *CC* и риске развития ГЭРБ у хакасов:  $OR=2,01$  при 95% CI (1,20-4,06). Генотип *TT* был редким и выявлен только в группе сравнения (5,0%).

Наиболее распространенным генотипом был вариант *R4R4 IL-1RA VNTR* как в группе больных ГЭРБ, так и в группе сравнения (80,0 и 80,0%, соответственно). Распределение гомо- (*R3R3*) и гетерозигот (*R4R3*) при ГЭРБ было сопоставимо с группой сравнения. Высокопродуктивный генотип *R2R2*, ассоциированный с тяжелым прогрессивным по тяжести течения воспалением, был выявлен только в группе здоровых доноров (3,7%).

В ходе исследования особенностей распределения полиморфизма *-174 G>C* гена *IL-6*, у хакасов, показано, что доля гетерозигот *CG* (22,0%) и гомозигот *GG* (78,0%) *IL-6* была сопоставима с таковым в группе сравнения (26,2 и 70,0%, соответственно). При этом гомозиготный генотип *CC* был обнаружен только в группе здоровых доноров (3,7%).

При оценке полиморфизма гена *IL-8* установлено, что доминирующим генотипом во всех обследованных группах хакасов, был вариант *TT IL-8*, (ГЭРБ – 50%, группа сравнения – 45%). Вторым по частоте встречаемости был гетерозиготный генотип *TA* (41% в группе с ГЭРБ, и 37% в группе сравнения). Вариант *AA* полиморфизма *T-251A IL-8* был выявлен у больных с ГЭРБ в 9% случаев, а в группе сравнения – 18%, соответственно.

В виду того, что статистическая значимость установлена только для *IL-1 $\beta$*  и его антагониста, дальнейший интерес представляла эта группа цитокинов. Антагонист рецептора

IL-1Ra связывается с рецепторами к IL-1 $\beta$ , расположенными на клетках, блокируя проведение сигнала. В ответ – количество рецепторов увеличивается, что ведет к гиперпродукции IL-1 $\beta$ , по принципу обратной положительной связи. Показано, что комбинации низкопродуцирующих вариантов CC и CT полиморфизма C+3953T гена IL-1 $\beta$  с высокопродуцирующим вариантом R4R4 гена IL-1Ra VNTR встречались у соответственно 48 и 24% пациентов с ГЭРБ.

При анализе ассоциации частоты встречаемости жалоб у пациентов с ГЭРБ у носителей гомо- (CC) и гетерозоготного (CT) вариантов гена IL-1 $\beta$  было показано, что при CC +3953 IL-1 $\beta$  статистически значимо чаще встречалась изжога ( $\chi^2=31,31$ ,  $p<0,001$ ), боли в подложечной области ( $\chi^2=85,11$ ,  $p<0,001$ ), эпигастрии ( $\chi^2=24,32$ ,  $p<0,001$ ), тошнота ( $\chi^2=4,69$ ,  $p=0,03$ ), рвота ( $\chi^2=7,32$ ,  $p<0,006$ ), кашель ( $\chi^2=7,96$ ,  $p=0,004$ ), срыгивание пищей ( $\chi^2=7,65$ ,  $p<0,005$ ).

**Заключение.** Таким образом, у пациентов с ГЭРБ, выявлены следующие доминирующие

генотипы: CC полиморфизма C+3953T гена IL-1 $\beta$ , R4R4 гена IL-1Ra VNTR, GG полиморфизма -174 G>C гена IL-6, TT гена IL-8. Возможный риск развития ГЭРБ у хакасов может быть ассоциирован с генотипом CC полиморфизма C+3953T гена IL-1 $\beta$ .

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки России в рамках базовой части государственного задания.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Агеева Е.С., Штыгашева О.В., Пуликов А.С., Буторин Н.Н. Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. 2011; 1 (77): 16-20.
2. Агеева Е.С., Штыгашева О.В., Рязанцева Н.В. Иммунология. 2010; 3: 131-133.
3. Цуканов В.В., Онучина Е.В., Васютин А.В. и др. Терапевтический архив. 2014; 86 (2): 23-26.
4. Hollegaard M. V., Bidwell J. L. Genes Immun. 2006; 7 (4): 269-276.
5. Mclean M. H., El-Omar E. M. Gastroenterology. 2010; 137: 17-30.

### CHARACTERISTIC OF GENETIC PREDISPOSITION OF RISK OF DEVELOPMENT OF GASTROESOPHAGEAL OF THE REFLUX DISEASE IN KHAKAS

Ageeva E. S., Manonina M. B., Taranova A. A., Butorin N. N.

Federal State-Funded Educational Institution of Higher Professional Education «Katanov Khakass State University», Abakan, Russia

The aim of the study: researches establishment of a role of polymorphism of a gene of IL-1 $\beta$  at GERB at Khakas was. Materials and methods: 204 persons of indigenus people are examined. The main group included 34 sick GERB. Investigated polymorphism C+3953T IL-1 $\beta$ , IL-1Ra VNTR, -174 G>C; C IL-6 and T-251A IL-8 of genes by method of the restrict analysis of products of amplification of specific sites of a genome. The analysis of association of polymorphisms with GERB – by means of criterion of the relation of chances (OR) with 95% of a confidential interval (CI – Confidence Intervals). The results of the study. It is revealed that the main genotype Khakas had CC +3953 IL-1 $\beta$  (81%) and R4R4 IL-1Ra VNTR (80,0%), CG (22,0%) and GG (78,0%) -174 G>C IL-6, TT T-251A IL-8 (50%). Conclusions: Thus, analyzing nature of distribution of polymorphism of genes at patients with GERB, the following dominating genotypes are revealed: CC polymorphism of C+3953T of a gene of IL-1 $\beta$ , R4R4 of a gene of IL-1Ra VNTR, GG of polymorphism -174 G>C; C gene of IL-6, IL-8 gene TT. Possible risk of development of GERB in Khakas: it can be associated with a genotype of CC of polymorphism of C+3953T of a gene of IL-1 $\beta$ .

*Key words:* GERD, polymorphism of genes, khakas.

## РОЛЬ МЕЖГЕННЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ ГЕНОВ ВРОЖДЕННОГО ИММУННОГО ОТВЕТА В ФОРМИРОВАНИИ ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТИ К ИНФИЛЬТРАТИВНОМУ ТУБЕРКУЛЕЗУ ЛЕГКИХ

Беляева С. В.<sup>1,2</sup>, Евдокимов А. В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБОУ ВПО «Челябинский государственный университет»; <sup>2</sup>ГБУЗ «Челябинская областная станция переливания крови», Челябинск, Россия

Проведен анализ межгенных взаимодействий генов врожденного иммунного ответа у больных инфильтративной формой туберкулеза методом MDR. Установлено, что наиболее значимым в фенотипической реализации развития инфильтративного туберкулеза у русских Челябинской области является вклад комбинации генов TNFA(-308)\*A и IL-10(-1082)\*G за счет их синергического взаимодействия. Для уточнения риска развития у больных инфильтративной формы в качестве дополнительных маркеров можно использовать гены IL-1(+3953)\*C и TNFA(-238)\*A.

**Ключевые слова:** инфильтративный туберкулез, полиморфизм генов, Multifactor Dimensionality Reduction.

**Актуальность и цель работы.** Туберкулез остается важной международной проблемой, представляя серьезную угрозу для общественного здоровья во многих странах мира, нанося человечеству колоссальный медицинский и экономический ущерб, являясь одной из ведущих причин смертности от инфекционных заболеваний. Большинство эпидемиологических данных поддерживают роль врожденного иммунного ответа в развитии туберкулеза [1], т.к. адекватное сетевое взаимодействие его факторов в основном приводит к элиминации патогена. В то же время гиперактивация или угнетение механизмов врожденного иммунитета может вызвать развитие активной формы туберкулеза [2]. Туберкулез – мультифакторное заболевание, для которого характерно отсутствие воспроизводимости результатов исследования монолокусных ассоциаций в различных популяциях. Объяснение данного феномена находят в явлении межгенных взаимодействий [1]. Наиболее распространенной формой туберкулеза легких является инфильтративная [1]. Мультилокусный анализ полиморфизма генов, влияющих на развитие инфильтративного туберкулеза, может выделить патогенетически значимые комбинации генов врожденного иммунного ответа.

**Цель:** выявление комбинаций генов воспалительного ответа (IL-1RA, IL-1 $\beta$ , IL-10, TNFA, TLR2 и TLR4), формирующих паттерны, ассоциированные с инфильтративной формой туберкулеза легких.

**Материалы и методы.** Исследуемую группу составили 53 больных с инфильтративной формой туберкулеза легких, находящихся на стационарном лечении в ГБУЗ «Челябинский областной клинический противотуберкулезный диспансер». Пациенты характеризовались инфильтратами более 1 см в одном или в двух легких и малосимптомным течением заболевания (32,08%), а также распространенными инфильтратами в фазе распада (67,92%) с бактериовыделением и клиническими проявлениями. В исследование включены больные из русской популяции, проживающие на территории Челябинской области, из социально-адаптированных слоев населения. Популяционная принадлежность определялась по данным генеалогического анамнеза до третьего поколения (согласно рекомендациям 8-го Международного Симпозиума в 1980 г., Лос-Анджелес, США).

Генотипирование генов цитокинов и TLR осуществляли путем ПДРФ-анализа (IL-1 $\beta$ , TNFA, TLR2 и TLR4) и аллель-специфической ПЦР (IL-10, IL-1RA). Выделение ДНК прово-

дили с использованием реагентов PROTRANS DNA Box 500 согласно инструкции производителя (Protrans, Germany). Для амплификации использовали прибор «Терцик» (НПФ «ДНК-Технология», Россия). Метод детекции результатов – электрофорез в 3% агарозном геле и 8% ПААГе.

Анализ межгенных взаимодействий проведен методом сокращения многофакторной размерности (Multifactor Dimensionality Reduction, MDR) в среде открытой программы MDR v.2.0 beta8 (<http://www.multifactor dimensionalityreduction.org>). Для оценки межгенных взаимодействий с помощью метода MDR был использован алгоритм всестороннего поиска (Exhaustive search algorithm), который рассматривал все возможные комбинации полиморфных локусов, выбранных для анализа межгенных взаимодействий, в отношении риска развития туберкулеза.

**Результаты.** Метод MDR был разработан для моделирования межгенных взаимодействий высокого порядка, которые невозможно оценить с помощью традиционно используемых в генетической эпидемиологии параметрических методов [3]. MDR позволил продемонстрировать сложный характер межгенных взаимодействий анализируемых полиморфных локусов генов-кандидатов инфильтративного туберкулеза.

В результате анализа взаимодействий исследованных генов в формировании предрасположенности к инфильтративному туберкулезу была установлена четырехлокусная модель IL-1 $\beta$ (+3953)\*C/TNFA(-308)\*A/TNFA(-238)\*A/IL-10(-1082)\*G, которая характеризовалась 80% воспроизводимостью (Cross-validation consistency) и точностью предсказания 46,15% (Testing balanced accuracy). Согласно параметрам данной модели наиболее тесное взаимодействие установлено для двухлокусной модели генов TNFA(-308)\*A/IL-10(-1082)\*G, которая характеризовалась 90% воспроизводимостью и точностью предсказания 49%. Полученные результаты согласуются с результатами монолокусного анализа ассоциаций: для

инфильтративной формы характерен провоспалительный цитокиновый генотип: высокие частоты аллеля TNFA(-308)\*A и генотипов TNFA(-308)\*G/A и TNFA(-308)\*A/A [2].

В данном исследовании мы установили, что на долю комбинации локусов TNFA(-308)\*A и IL-10(-1082)\*G приходится 6,89% фенотипической энтропии, что демонстрирует выраженный синергический эффект полиморфизмов при формировании предрасположенности к развитию инфильтративной формы туберкулеза. Согласно схеме Fruchterman-Rheingold, из четырех анализируемых полиморфизмов наибольшим предсказательным потенциалом обладает полиморфизм IL-10(-1082)\*G – 4,13%. В результате анализа установлено, что полиморфные локусы IL-1 $\beta$ (+3953)\*C и TNFA(-238)\*A оказывают выраженный независимый эффект в формировании инфильтративной формы туберкулеза, а локусы TNFA(-308)\*A и TNFA(-238)\*A имеют отрицательные эффекты, что совпадает с данными литературы.

Исходя из данных анализа, представляется возможным сделать заключение о ведущей роли полиморфизма IL-10(-1082)\*G и комбинации локусов TNFA(-308)\*A/IL-10(-1082)\*G в развитии инфильтративного туберкулеза среди всех анализируемых в данной работе однонуклеотидных полиморфизмов. Вклад полиморфных вариантов генов IL-1 $\beta$ (+3953)\*C и TNFA(-238)\*A представляется менее существенным и может нести дополнительную смысловую нагрузку в контексте совместного определения при генетическом тестировании для уточнения риска развития у больных инфильтративной формы.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Van Crevel R., Ottenhoff T.H.M., van der Meer J.W.M. *Clinical Microbiology Reviews* 2002, 15 (2), 294-309.
2. Беляева С.В., Сташкевич Д.С. *Российский иммунологический журнал* 2014, 8 (17), 775-778.
3. Moore J. *Expert Review of Molecular Diagnostics* 2004, 4 (6), 795-803.

## ROLE OF INTERGENIC INTERACTIONS OF GENES OF INNATE IMMUNE RESPONSE IN THE FORMATION OF PREDISPOSITION TO INFILTRATIVE PULMONARY TUBERCULOSIS

Beliaeva S. V.<sup>1,2</sup>, Evdokimov A. V.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Chelyabinsk State University; <sup>2</sup>Chelyabinsk regional hemotransfusion station, Chelyabinsk, Russia

The analysis of intergenic interactions of genes of the innate immune response in patients with infiltrative tuberculosis was carried out via MDR method. It was found that most significant aspect in realization of phenotypic infiltrative tuberculosis in Russian population of Chelyabinsk region is the contribution of combinations of genes TNFA(-308)\*A and IL-10(-1082)\*G due to their synergistic interaction. To clarify the risk of the infiltrative forms' development in patients with tuberculosis genes IL-1 $\beta$ (+3953)\*C and TNFA(-238)\*A can be used as additional markers.

---

## ИММУНОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ У РАБОТАЮЩИХ В УСЛОВИЯХ СОЧЕТАННОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ ПЫЛИ И ПРОИЗВОДСТВЕННОГО ШУМА

Долгих О. В.<sup>1,2,3</sup>, Кривцов А. В.<sup>1</sup>, Бубнова О. А.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения»; <sup>2</sup>ФГБОУ ВПО «Пермский государственный национальный исследовательский университет»; <sup>3</sup>ФГБОУ ВПО «Пермский государственный национальный исследовательский политехнический университет», Пермь, Россия

Результаты генетического анализа полиморфизма генов выявили преимущественные нарушения у женского работающего контингента по критерию распространенности минорного аллеля генов 1 и 2 фаз детоксикации, нейро-эндокринной регуляции, функции жирового и энергетического обменов, генов иммунной регуляции и апоптоза. Белки иммунной регуляции (фактор некроза опухоли альфа, FAS-рецептор) и кандидатные аллели их генов рекомендуется использовать в качестве маркеров чувствительности и эффекта при оценке риска здоровью комбинации вредных производственных факторов (шум и пыль).

*Ключевые слова:* ген TNF альфа, ген FAS-рецептора, шум.

**Актуальность.** Необходимо развитие исследований и методического базиса в этом направлении для профилактического обеспечения путей защиты и стабилизации генома человека в условиях возрастающего загрязнения среды, в том числе производственной [1, 4]. Восприимчивость организма к воздействию средовых химических и физических факторов в значительной мере зависит от особенностей

генетических ассоциаций определяющих активность ферментов системы детоксикации ксенобиотиков и состояния компонентов иммунного ответа [4]. Актуальным на сегодняшний день является выделение маркерных иммунологических и генетических показателей, которые могут быть использованы в качестве ранних маркеров нарушений здоровья работающих [2, 3].

**Цель работы** – оценка иммуногенетических особенностей здоровья работающих на предприятии цветной металлургии Пермского края.

**Материалы и методы.** Группу наблюдения составили 66 человек, работающих на предприятии «Ависма» Пермского края. В указанную группу включены работники с профессиями: выбивщик титановой губки (ТГ) и сортировщик титановой губки (ТГ). В том числе 29 мужчин, 44% от общего числа группы (выбивщики ТГ) и 37 женщин, 56% от общего числа группы (все сортировщики ТГ). Средний возраст в группе наблюдения составляет  $36,9 \pm 2,4$  года. Группу сравнения составили инженерно-технические работники (ИТР), численность группы – 52 человека (44,2% мужчин и 55,8% женщин), средний возраст которых составляет  $36,3 \pm 1,4$  года, средний стаж  $12,5 \pm 1,2$  года. Группы были сопоставимы по возрасту, полу, стажу, этническому составу.

Исследовали следующие параметры иммунной системы: маркеры межклеточной иммунной регуляции фактор некроза опухоли, содержание карцинальных антигенов (СА724, СА199, ПСА, СА153), релаксина, эритропоэтина, гомоцистеина – методом иммуноферментного анализа с помощью тест-систем. Изучение маркеров клеточной дифференцировки методом проточной цитометрии – определение популяций и субпопуляций лимфоцитов ( $CD3^+$ ,  $CD4^+$ ,  $CD8^+$ ,  $CD19^+$ ,  $CD16^+CD56^+$ ,  $CD25^+$ ,  $CD95^+$ ) на проточном цитометре FACSCalibur фирмы «Becton Dickinson».

Проведено изучение полиморфизма генов цитохром-450, MTHFR, GSTA4 (глутатион-трансфераза), SOD2, ZMPSTE24 (цинк-металлопептидаза), TERT, FAS, FOXP3, MMP9, TNFальфа. Для определения генотипа человека использовали метод аллельной дискриминации, когда различия между гетерозиготами, гомозиготами дикого и минорного вариантов устанавливали по различиям в протекании реакций амплификации соответствующих праймеров. Обработка данных по генотипированию проводилась с использованием унифицированной программы «Ген Эксперт».

**Результаты.** При анализе результатов аттестации рабочих мест по условиям труда, установлено, что условия труда раздельщиков ТГ и сортировщиков ТГ ОПУ-1 цеха № 35 характеризуются сочетанным воздействием нанодисперсной пыли и производственного

шума. Уровень шума на рабочем месте выбивщика и сортировщика ТГ достигает 88 дБА, что на 8 дБА превышает предельно допустимый уровень (ПДУ 80 дБА), и соответствует 2 степени вредности третьего класса опасности (3.2). В образцах плазмы крови группы наблюдения преобладают частицы диапазона 0-30 нм, на их долю приходится в среднем 61% (среднее процентное содержание в группе сравнения 48,8%).

У обследованных работающих выявлены изменения клеточного и гуморального звена иммунного ответа: повышенный по сравнению с контролем уровень фетальных белков (СА 153) – превышение у женщин в 1,2 раза; повышено содержание гомоцистеина у 61,8% женщин группы наблюдения ( $13,156 \pm 1,505$ , при норме 4,6-12,44 мкмоль/дм<sup>3</sup>), тогда как в группе сравнения превышений границ нормы не наблюдалось, а у мужчин в данных условиях уровень гомоцистеина повышен у 14% ( $11,589 \pm 1,105$ ) – контроль  $9,594 \pm 0,921$  – без достоверности отклонений; наблюдаются достоверные отклонения показателей CD-иммунограммы в сравнении с референтным уровнем – снижение абсолютного и относительного содержания активационных маркеров  $CD95^+$  и  $CD25^+$  (у 100% пациентов).

Результаты генетического анализа: Мужская основная группа характеризовалась преобладанием вариантного аллеля над показателями группы контроля и женской подгруппой по следующим полиморфизмам генов: цитохрома CYP1A1, копропорфириногенаксидазы CPOX, рецепторов запуска процедуры апоптоза FAS и TNF, метилентетрагидрофолатредуктазы MTHFR, отвечающих за детоксикацию, нервную и эндокринную регуляцию, жировой и энергетический обмен. Генотип работающих женщин характеризовался следующими генами с повышенной полиморфностью: металлопротеиназы MMP, цинк-металлопептидаза ZMPSTE, фактора некроза опухоли TNF, метилентетрагидрофолатредуктазы MTHFR, отвечающих за детоксикацию, иммунную, нервную и эндокринную регуляцию, как за счет гетерозиготного так и за счет гомозиготного вариантного генотипов.

**Вывод.** Выявлены достоверные нарушения клеточного звена иммунитета (повышение ФНО, угнетение T-клеточных рецепторов  $CD25^+$ ,  $CD95^+$ ), гуморального звена иммунитета преимущественно в женской подгруппе



(снижение уровня релаксина и эритропоэтина, а также повышенный уровень СА153). Результаты генетического анализа полиморфизма генов выявили преимущественные нарушения у женщин по критерию распространенности минорного аллеля генов 1 и 2 фаз детоксикации, а также генов иммунной регуляции и апоптоза. Белки иммунной регуляции (фактор некроза опухоли альфа, FAS-рецептор) и кандидатные аллели их генов рекомендуется использовать в качестве маркеров чувствительности и эффекта при оценке риска здоровью комбинации вредных производственных факторов (шум и пыль).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Долгих О. В., Кривцов А. В., Харахорина Р. А., Ланин Д. В. Вестник Уральской медицинской академической науки. 2012,4, 240-241.
2. Долгих О. В., Кривцов А. В., Бубнова О. А., Предеина Р. А., Дианова Д. Г., Синицина О. О., Мажлютина Н. Н., Тараненко Л. А. Медицина труда и промышленная экология. 2013,11,9-12
3. Долгих О. В., Зайцева Н. В., Дианова Д. Г. Вестник НГУ. Серия: Биология, клиническая медицина. 2012, Т. 10. Вып. 4, 112-115
4. Dolgikh O., Zaitseva N., Dianova D. Molecular markers of apoptosis in industrial workers //In vivo: international Journal of Experimental and Clinical Pathophysiology and Drug Research. 2011, Vol. 25, 3. 523-524

### IMMUNOGENETIC INDICATORS IN WORKERS OCCUPIED UNDER EXPOSURE TO DUST AND INDUSTRIAL NOISE

Dolgikh O. V.<sup>1,2,3</sup>, Krivtsov A. V.<sup>1</sup>, Bubnova O. A.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>FBSI «Federal Scientific Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies»;

<sup>2</sup>FSBEI HPE «Perm State National Research University»; <sup>3</sup>FSBEI HPE «Perm State National Research Polytechnic University», Perm, Russia

Abstract. The results of the genetic analysis of gene polymorphism have revealed preferential disorders in female working contingent due to the criterion of the prevalence of the minor allele of gene 1 and 2 phases of detoxification, neuro-endocrine regulation, the functions of fat and energy metabolism, immune regulation genes, and apoptosis. Proteins of immune regulation (Tumour necrosis factor-alpha, FAS-receptor) and Candidate alleles of genes is recommended to use as markers of sensitivity and effect when assessing health risk from the combination of harmful factors (noise and dust).

Key words: TNF-alpha gene, FAS-receptor gene, noise.

### КАНДИДАТНЫЕ ГЕНЫ НАРУШЕНИЙ ИММУННОГО ОТВЕТА У ДЕТЕЙ В УСЛОВИЯХ ЭКСПОЗИЦИИ ХЛОРОФОРМОМ

Долгих О. В.<sup>1,2,3</sup>, Бубнова О. А.<sup>1,2</sup>, Безрученко Н. В.<sup>1,2</sup>,  
Лучникова В. А.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения»; <sup>2</sup>ФГБОУ ВПО «Пермский государственный национальный исследовательский университет»; <sup>3</sup>ФГБОУ ВПО «Пермский государственный национальный исследовательский политехнический университет», Пермь, Россия

Результаты генетического анализа полиморфизма генов выявили преимущественные нарушения распространенности минорного аллеля генов иммунной регуляции и апоптоза, а также генов 1 и 2 фаз детоксикации. Белки иммунной регуляции (HLA DR1, FAS-рецептор) и кандидатные аллели их генов рекомендуется использовать в качестве маркеров чувствительности и эффекта при оценке риска здоровью в условиях поступления избыточных концентраций хлороформа с питьевой водой. Выявлен измененный генетический полиморфизм генов CYP1A1, GSTA4, TERT, MPM9, а также их ассоциация с контаминацией биосред хлороформом и специфическим иммунологическим ответом.

Ключевые слова: полиморфизм генов, ген HLA DR1, ген FAS, хлороформ.

Использование современных диагностических иммунологических и молекулярно-генетических технологий, в частности ПЦР, позволяет провести объективную и достоверную оценку иммунного ответа и полиморфизма его генов у населения в условиях повышенной внешнесредовой химической нагрузки [1,2,3,4]. Нарушения здоровья, обусловленные факторами водной среды измененной продуктами хлорирования, определяют целесообразность научно-исследовательских работ по определению индивидуальной чувствительности организма к действию хлорорганических соединений и функционального состояния систем генетической и иммунной регуляции гомеостаза.

**Цель работы** – анализ изменения иммунологических и генетических маркеров у детского населения в условиях контаминации водной среды хлороформом (на примере Пермского края).

**Материалы и методы.** Выполнено комплексное обследование 89 детей в возрасте от 3 до 7 лет, которые постоянно проживают и посещают детские сады на территории Пермского края с повышенным содержанием хлороформа в питьевой воде. Группу сравнения составили 46 детей, проживающие на экологически благополучной территории. Группы были сопоставимы по соматической заболеваемости и этнической принадлежности.

Исследования биосред (кровь) на содержание хлорорганических углеводов (хлороформ) выполнялось методом анализа равновесной паровой фазы на газовом хроматографе «Кристалл-5000» с капиллярной колонкой DB-624 и селективным детектором электронного захвата (ДЭЗ) в соответствии методическими указаниями с МУК 4.1.2115-06. Фенотипирование лимфоцитов проводили на проточном цитометре FACSCalibur фирмы «Becton Dickinson» с использованием универсальной программы CellQuestPrO. Определение популяций и субпопуляций лимфоцитов (CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup>, CD95<sup>+</sup>) проводили методом мембранной иммунофлуоресценции с использованием панели меченых моноклональных антител к мембранным CD-рецепторам («Becton Dickinson», USA), при этом регистрировали суммарно не менее 10 000 событий. Маркеры пролиферативных реакций (CA 72-4, CA 19-9) определялись с помощью иммуноферментного анализа на анализаторе

«Elx808IU». Специфические к хлороформу IgG определяли методом модифицированного конкурентного иммуноферментного анализа на анализаторе «Elx808IU» (США) согласно МР 111-14/55-04-02 [3].

Проведено изучение полиморфизма генов детоксикации: CYP1A1 (цитохром), GSTA4 (глутатион-трансфераза), гена процедуры апоптоза FAS, гена ГКГС HLA DR1, TERT (теломераза), MMP9 (металлопротеиназа). Обработка данных по генотипированию проводилась с использованием унифицированной программы «Ген Эксперт».

**Результаты.** Средние концентрации хлороформа в пробах воды исследуемой территории превосходили примерно в 2,5 раза аналогичные концентрации в пробах воды территории сравнения ( $p < 0,05$ ). Проведенное химико-аналитическое исследование выявило повышенные уровни хлороформа в биосредах обследуемых детей – в 2,0 раза, выше, чем в крови детей территории сравнения.

Установлен достоверно повышенный относительно референтных значений уровень специфической сенсibilизации к хлороформу по критерию IgG у 41,8% детей, с достоверным различием от нормальных значений. Анализ отношения шансов изменения маркеров специфической сенсibilизации при возрастании концентрации контаминантов в биологических средах позволил установить достоверное ( $p < 0,05$ ) повышение концентрации IgG к хлороформу при увеличении концентрации четыреххлористого углерода в крови ( $R^2 = 0,50$  при  $p < 0,05$ ).

Наблюдаются достоверные отклонения показателей CD-иммунограммы в сравнении с референтным уровнем – снижение активационного маркера CD25<sup>+</sup>, а также CD95<sup>+</sup> (у 26,7–63,3% детей). Результаты моделирования отношения шансов изменения иммунологических тестов при возрастании концентрации контаминантов в биологических средах позволило установить достоверное ( $p < 0,05$ ) понижение CD4<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup>, CD95<sup>+</sup> при увеличении концентрации хлороформа ( $R^2 = 0,68–0,87$  при  $p < 0,05$ ).

В результате оценки полиморфизм генов иммунорегуляции и ферментов 1 и 2 фазы детоксикации ксенобиотиков была выявлена достоверно повышенная ( $p < 0,05$ ) распространенность патологического аллеля гена цитохрома (3,0 раза, а также гетерозиготного ге-

нотипа гена глутатион-S-трансферазы (в 4,0 раза) у обследуемых детей относительно группы сравнения. Аллельный полиморфизм гена металлопротеиназы характеризуется наличием достоверных различий группы наблюдения с группой сравнения (повышение распространенности мутантного аллеля MMP9 в 2,5 раза). Повышены распространенность вариантного гомозиготного генотипа гена FAS и гетерозиготного варианта генов HLA DR1 и теломеразы TERT по отношению к группе сравнения. Наблюдается достоверная взаимосвязь содержания ключевых ферментов и ответственных за них кандидатных генов ( $p < 0,05$ ).

**Вывод.** Проведенное обследование детского контингента, проживающего в условиях контаминации питьевой воды хлороформом, выявило повышение экспрессии онкопролиферативных белков (CA 72-4, CA 19-9) и специфической чувствительности к компонентам факторной нагрузки (повышение содержания IgG к хлороформу), а также генетические нарушения экспрессии иммунорегулятор-

ных белков ассоциированные с полиморфизмом кандидатных генов иммунной системы: ген рецептора запуска процедуры апоптоза FAS, CYP1A1 (цитохром), GSTA4 (глутатион-трансфераза), ген главного комплекса гистосовместимости HLA DR1, TERT (теломераза), MMP9 (металлопротеиназа), характеризующих специфические различия между анализируемыми группами.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Долгих О. В., Кривцов А. В., Бубнова О. А., Алексеев В. Б. Анализ риска здоровью. 2013,4, 77-81.
2. Долгих О. В., Зайцева Н. В., Дианова Д. Г., Лыхина Т. С., Кривцов А. В., Гугович А. М. Биологические мембраны. 2012,29,5, 349-353
3. Zaitseva N. V., Dianova D. G., Dolgikh O. V. European journal of natural history. – 2014. – № 1. – С. 7–8
4. Dolgikh O. V., Kharakhorina R. A., Dianova D. G., Gugovich A. M. Proceedings of the 3rd International Academic Conference «Applied and Fundamental Studies», 2013 – С. 149-152

#### CANDIDATE GENES OF IMMUNE RESPONSE IN CHILDREN UNDER EXPOSURE TO CHLOROFORM

Dolgikh O. V.<sup>1,2,3</sup>, Bubnova O. A.<sup>1,2</sup>, Bezruchenko N. V.<sup>1,2</sup>,  
Luchnikova V. A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>FBSI «Federal Scientific Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies»;

<sup>2</sup>FSBEI HPE «Perm State National Research University»; <sup>3</sup>FSBEI HPE «Perm State National Research Polytechnic University», Perm, Russia

**Abstract.** The results of the genetic analysis of gene polymorphism have revealed the preferential violations of the prevalence of minor allele genes of immune regulation and apoptosis. Proteins of immune regulation (HLA DR1, FAS-receptor) and candidate alleles of their genes is recommended to use as markers of sensitivity and effect in health risk assessment of the child population of exposure to excessive concentrations of chloroform in drinking water. The changed genetic polymorphism of genes CYP1A1, GSTA4, TER, MMP, as well as their association with the contamination of biological media with chloroform and specific immunological response have been revealed.

**Key words:** HLA-DR1 gene, FAS gene, chloroform.

## ЧАСТОТА ВСТРЕЧАЕМОСТИ ТОЧКОВОЙ ЗАМЕНЫ 745С>Т ГЕНА TLR6 В ОСНОВНЫХ ПОПУЛЯЦИЯХ ЧЕЛЯБИНСКОЙ ОБЛАСТИ

Евдокимов А. В., Бурмистрова А. Л., Сташкевич Д. С.

*ФГБОУ ВПО Челябинский государственный университет,  
Челябинск, Россия*

В данной статье проводится сравнение основных популяций Челябинской области (русских, татар, башкир и нагайбаков) по частоте встречаемости точкового полиморфизма 745С>Т гена толл-подобного рецептора 6. Генотипирование популяции татар южно-уральского региона по полиморфизму 745С>Т гена толл-подобного рецептора 6 проводится впервые. Полученные данные могут использоваться для дальнейшего изучения ответа на инфекцию в различных популяциях.

*Ключевые слова:* TLR6, полиморфизм, татары, русские, башкиры, нагайбаки.

**Актуальность и цель работы.** Основной функцией толл-подобных рецепторов (TLRs) является узнавание молекулярных микробных компонентов и запуск механизмов врождённого иммунитета в ответ на инфекцию [1]. TLRs связывают компоненты вирионов, клеток бактерий, характерные для различных патогенов и распространённые универсально. Полногеномные исследования, затрагивающие области генов TLRs, позволили установить, что данные гены содержат большое количество однонуклеотидных полиморфизмов, представляющих собой точковые замены нуклеотидов в определённом положении [2]. Частота встречаемости некоторых полиморфизмов достоверно различается в мировых человеческих популяциях. К подобным полиморфизмам относится точковая замена 745С>Т, расположенная в области гена TLR6. Аллель с заменой (745\*Т) распространён с довольно высокой частотой (около 50%) в популяциях европеоидного происхождения, в то время как в монголоидных популяциях практически не встречается [2, 3]. Функциональные исследования этого полиморфизма выявили связь между аллелем 745\*Т и снижением уровня активации TLR6. Высокую частоту этого аллеля в европеоидных популяциях связывают с адаптивными преимуществами в условиях частых эпидемий в Европе [3]. Уральский регион представляет собой интересную терри-

торию для популяционно-генетических исследований: это перекрёсток миграционных путей из Азии и Европы [4].

**Цель работы:** определить частоту встречаемости аллелей и генотипов по точковому полиморфизму 745С>Т гена толл-подобного рецептора 6 (TLR6) в популяциях русских, нагайбаков, татар и башкир Челябинской области и провести между ними сравнение.

**Материалы и методы.** Для исследования были отобраны образцы венозной крови представителей четырёх этнических популяций: русские (156 человек), башкиры (144 человека), татары (93 человека) и нагайбаки (100 человек), проживающих на территории Челябинской области. Принадлежность к этнической группе определялась по данным генеалогического анамнеза в трёх поколениях (согласно рекомендациям 8-го Международного Симпозиума в 1980 г., Лос-Анджелес, США). Геномная ДНК была выделена из образцов венозной крови с использованием реагентов Ахуген (Quiagen, Германия) согласно инструкции производителя. Определение точковой замены 745С>Т в гене TLR6 проводилось с помощью набора реагентов фирмы НПФ «Литех» (Москва). Амплификацию проводили в приборе ТПЧ-ПЦР-01-«Терцик» (НПФ ДНК-Технология, Москва). Детекция результатов осуществлялась электрофоретически в 3% агарозном геле. Статистическая об-

работка данных была проведена при помощи средств программного пакета MedCalc версии 12.1.0.0 (Medcalc Software bvba). Проверка полученных частот генотипов в популяциях на соответствие закону Харди – Вайнберга была проведена с использованием критерия  $\chi^2$  Пирсона; статистически значимыми считались различия при  $p < 0,050$ . Для сравнения популяций между собой был использован критерий  $\chi^2$  с поправкой Бонферрони на попарные сравнения: достоверными считались различия при  $p < 0,008$ .

**Результаты.** Проверка полученных частот распределения генотипов TLR6 745C>T на соответствие закону Харди-Вайнберга не выявила статистически значимых отклонений для исследованных популяций ( $p=0,819$  для русских,  $p=0,835$  для нагайбаков,  $p=0,924$  для башкир и  $p=1,000$  для татар). Применение критерия  $\chi^2$  позволило обнаружить статистически значимые различия в частотах встречаемости аллелей и генотипов между популяцией башкир и остальными популяциями. Аллель 745\*С в популяции башкир встречался чаще (84,0%), а аллель 745\*Т – реже (16,0%), чем у татар (70,4% и 29,6%;  $\chi^2_{[1]}=11,66$ ,  $p=0,0006$ ), нагайбаков (69,0% и 31,0%;  $\chi^2_{[1]}=14,61$ ,  $p=0,0001$ ) и русских (61,2% и 38,8%;  $\chi^2_{[1]}=37,66$ ,  $p<0,0001$ ). В сравнении с остальными популяциями, более распространённым генотипом у башкир были гомозиготы 745СС (70,1%), частоты встречаемости гетерозигот 745СТ (27,8%) и гомозигот 745ТТ (2,1%) были меньше. В популяции татар аналогичные значения составили 49,5%, 41,9%, 8,6% ( $\chi^2_{[2]}=12,47$ ,  $p=0,002$ ), у нагайбаков – 46,0%, 46,0%, 8,0% ( $\chi^2_{[2]}=15,85$ ,  $p=0,0004$ ) и у русских – 35,9%, 50,6%, 13,5%

( $\chi^2_{[2]}=38,76$ ,  $p<0,0001$ ). Популяции русских, нагайбаков и татар по аллельным частотам и частотам генотипов между собой достоверно не различались.

В соответствии с данными литературы, для популяций европеоидного происхождения, по сравнению с монголоидными, характерна более высокая частота встречаемости аллеля TLR6 745\*Т [2, 3]. В проведённом исследовании популяция башкир статистически значимо демонстрировала низкую частоту аллеля 745\*Т в сравнении с остальными популяциями, что связано со значительным монголоидным компонентом в генофонде этой популяции [5]. Более высокая доля аллеля 745\*Т среди русских указывает на их европеоидное происхождение и аллохтонный характер этой популяции по отношению к территории Челябинской области. В популяциях татар и родственников им нагайбаков частота указанного аллеля также довольно высока, что может быть связано с путями миграции их предков на территорию Европы [5].

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Takeda K., Kaisho T., Akira S. *Annu Rev Immunol* 2003, 21, 335-376.
2. Barreiro L.B., Quintana-Murci L. *Nature Review Genetics* 2010, 11, 17-30.
3. Quintana-Murci L., Clark A.G. *Nat Rev Immun* 2013, 13 (4), 280-293.
4. Хуснутдинова Э.К. *Вестник Российской академии наук* 2003, 73 (7), 614-621.
5. Чернова М.С. Иммуногенетический профиль популяций Челябинской области (русские, татары, башкиры, нагайбаки) в структуре мировых популяций. Автореф. дис. канд. биол. наук. Челябинский государственный университет, Челябинск 2014.

### THE FREQUENCY OF THE TLR6 745C>T SUBSTITUTION IN THE MAJOR CHELYABINSK REGION POPULATIONS

Evdokimov A. V., Burmistrova A.L, Stashkevich D.S.

*Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russia*

In this article the frequency of toll-like receptor 6 gene 745C>T single nucleotide polymorphism in major Chelyabinsk Region populations (Russians, Tatars, Bashkirs and Nagaibaks) has been compared. The genotyping of the South Ural Tatars on the toll-like receptor 6 gene 745C>T was conducted for the first time. Obtained data can be used for the further study of the infection response in different populations.

## ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЙ ЭФФЕКТ РНК-ИНТЕРФЕРЕНЦИИ ГЕНА WNT-1

Зубков Д. А.<sup>1</sup>, Лысенко А. А.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН; <sup>2</sup>ФБУН Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г. Н. Габричевского, г. Москва

Терапия рака является одной из наиболее сложных проблем современного здравоохранения. Поиск альтернативных химиотерапии подходов к лечению рака ведется в различных направлениях. Одним из способов замедления роста раковых клеток являются РНК интерференции ключевых для деления опухолевых клеток генов. В данной работе сконструировано и клонировано 5 шпилечных конструкций малых интерферирующих РНК (shRNA) к гену Wnt-1, получены лентивирусы, несущие соответствующие конструкции. Среди 5 полученных конструкций только W1 и W3 эффективно подавляли экспрессию гена Wnt-1, что было показано qPCR и блотом. Анализ противоопухолевого эффекта отобранных вирусов W1 и W3 провели в модели рака молочной железы у мышей C57BL/6 с перевитой опухолью Wnt-1. Показали, что оба типа лентивирусов W1 и W3, но не контрольные вирусы, несущие репортерный ген GFP, достоверно подавляли рост опухоли. Комбинация W1+W3 не увеличивала эффективность терапии, показывая, что эффект РНК терапии только ограничивает, но полностью не останавливает рост опухоли.

**Ключевые слова:** РНК-интерференция, лентивирусы, противоопухолевая терапия, рак молочной железы Wnt-1, мышинная модель.

**Актуальность и цель работы.** Терапия рака является одной из наиболее сложных проблем современного здравоохранения. Поиск альтернативных химиотерапии подходов к лечению рака ведется в различных направлениях. Одним из способов замедления роста раковых клеток является РНК-интерференция ключевых для деления опухолевых клеток генов [1, 2]. Мыши Wnt-1 получены гиперэкспрессией гена сигнального пути Wnt-1, что привело к спонтанному формированию опухолей молочных желез у таких мышей [3, 4]. Соответственно, подавление экспрессии гена Wnt-1 с помощью РНК-интерференции может оказывать противоопухолевый эффект. В данной работе сконструированы и клонированы шпилечные конструкции малых интерферирующих РНК (shRNA) к гену Wnt-1 и получены лентивирусы, несущие соответствующие конструкции.

**Материалы и методы.** Для клонирования были сконструированы две новые последовательности, а также выбраны три ранее опубликованные. Выбранные последовательности shRNA клонированы во временный вектор

pSilencer puro, а затем переклонированы в лентивирусный вектор pLV-neo. Правильность клонированных последовательностей подтвердили секвенированием. Плазмиды были наработаны и выделены в препаративных количествах, проверены с помощью рестрикционного анализа и использованы для наработки лентивирусов. Лентивирусы нарабатывали в клетках HEK-293T. Для этого клетки трансфецировали плазмидами-паковщиками CMV и VSV и одной из shWnt-1 (W1-W5). Для визуализации эксперимента и определения эффективности упаковки частиц была сконструирована плазида-репортер на основе векторов pLV-neo и pEGFPN1. Отбирали супернатанты трансфецированных клеток, содержащие лентивирусы, концентрировали ультрафильтрацией на мембране с отсечкой 100 кДа (Millipore) и использовали для экспериментов *in vitro* и *in vivo*. Для анализа эффекта интерференции *in vitro* была получена стабильная линия W1308 из первичного рака Wnt-1. Подавление экспрессии гена Wnt-1 лентивирусами оценивали количественной полимеразной цепной реакцией (qPCR) и блотом с исполь-

зованием антител к белку p24 лентивирусных частиц. Подавление опухолевого роста оценивали у мышей линии C57BL/6, которым пересаживали опухоль Wnt-1. Лентивирусы вводили мышам с пальпируемой опухолью внутривенно 5 раз с интервалом в 3-4 дня. Эффект оценивали по размеру опухоли.

**Результаты и обсуждение.** Было получено 5 типов лентивирусов, содержащих шпилечные конструкции для интерференции гена Wnt-1: W1, W2, W3, W4 и W5, а также репортерные лентивирусы, несущие ген GFP. Титр вирусов оценивали с помощью цитотоксического теста на монослой клеток НЕК-293Т. После концентрирования титр лентивирусов составлял  $1 \times 10^8$ – $5 \times 10^8$  в зависимости от конструкции. Анализ эффективности подавления экспрессии гена с помощью qPCR и блота показал, что лучший эффект оказывали вирусы W1 и W3, которые были далее отобраны для экспериментов *in vivo*. Для этого мышам пересаживали  $10^6$  клеток Wnt-1 в жировую подушку № 4. После появления пальпируемых опухолей мышей делили на группы так, чтобы в каждой группе находились мыши с разным размером

опухоли. При этом средний размер опухолей до введения лентивирусов достоверно не отличался между группами. Мышам вводили вирусы W1, W3, W1+W3, GFP и фосфатный буфер в группе контроля. Анализ роста опухоли показал, что GFP –содержащий стимулировал рост опухоли ( $p=0,09$ ), а вирусы W1 и W3 – достоверно подавляли ее рост ( $p<0,05$  по *t*-критерию Стьюдента). Введение смеси W1+W2 не увеличивало эффективности терапии лентивирусами. Таким образом, нами впервые показан противоопухолевый эффект терапии рака молочной железы с помощью РНК-интерференции.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Niu Z., Li X., Hu B. et al. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai) 2012, 44 (12), 991-998.
2. Tang H., Kong Y., Guo J. et al. Cancer Lett 2013, 340 (1), 72-81.
3. Bocchinfuso W.P., Hively W.P., Couse J.F. et al. Cancer Res 1999, 59 (8), 1869-1876.
4. Li Y., Hively W.P., Varmus H. E. Oncogene 2000, 19 (8), 1002-1009.

#### ANTITUMOR EFFECT OF RNA INTERFERENCE OF WNT-1 GENE

Zubkov D.A.<sup>1</sup>, Lysenko A.A.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>M.M. Shemyakin and Yu.A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the RAS;

<sup>2</sup>Gabrichevsky Moscow Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia

The therapy of tumors represents one of the most complicated problems of the health care. The search for alternative to chemotherapy approaches to the treatment of oncological diseases is extensive. One of the ways to delay the growth of tumor cells is the effect of RNA interference of key genes essential for the growth of tumor cells. In this work we constructed and cloned 5 hair-pin small RNA (shRNA) interfering with Wnt-1 gene. Among five constructs, only W1 and W3 effectively down-regulated the Wnt-1 gene as was shown by qPCR and blot. Antitumor activity of W1 and W3 was analyzed in murine model of breast cancer Wnt-1 in C57BL/6 mice. We demonstrated that both W1 and W3 but not control GFP bearing lentivirus suppressed the growth of Wnt-1 tumor. Combination of W1+W3 did not improve the effect of therapy showing that siRNA therapy can only limit but not completely abrogate the tumor growth.

## ИММУНОГЕНЕТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ МНОГОБАЦИЛЛЯРНОЙ И МАЛОБАЦИЛЛЯРНОЙ ЛЕПРЫ

Сароянц А. В., Наумов В. З.

ФГБУ «НИИ по изучению лепры» Минзграва России, Астрахань, Россия

Обследовано 100 больных многобактериальной формой лепры (МВ), 49 малобактериальной формой (РВ) и 108 доноров русской популяционной группы, 29 больных МВ, 37 РВ формой заболевания и 70 доноров, представителей казахской популяционной группы, проживающих в Астраханской области. ДНК выделяли из крови методом высаливания. Генотипирование по генам HLA класса II (DRB1, DQA1, DQB1) проводили методом мультипраймерной ПЦР. Установлено, что независимо от этнической принадлежности больных гаплотип DRB1\*01-DQA1\*0101-DQB1\*0501 ассоциирован с РВ формой, а гаплотип DRB1\*15-DQA1\*0102-DQB1\*0602/08 с более тяжелой МВ формой лепры как в русской, так и в казахской популяционных группах.

*Ключевые слова:* лепра, генотипирование, HLA, гаплотипы.

В 1982 году ВОЗ предложила использовать для классификации лепры две группы: многобактериальную (multibacillary – МВ) и малобактериальную (paucibacillary – РВ), отличающиеся не только по клинической картине, но и по эпидемиологической значимости, а также по курбельности, частоте и характеру возможных инвалидизирующих осложнений.

Хотя лепра может поражать представителей различных этнических групп, хорошо известно, что частота развития МВ и РВ лепры весьма различается как в расовом, так и географическом отношении. Примерно 20% случаев заболевания лепрой в Индии – МВ формы, в то же время у жителей Японии, Китая и Кореи они составляют 30%-40%, а в Центральной Африке до 10% от общей распространенности заболевания [1]. В России процент больных МВ лепрой составляет 40%-50%.

Для установления HLA-ассоциаций было проведено изучение распределения аллелей и гаплотипов HLA II класса у больных с МВ и РВ формами лепры.

Обследовано 100 больных МВ, 49 больных РВ лепрой и 108 здоровых доноров, представителей русской популяционной группы, а также 29 больных МВ, 37 больных РВ формами лепры и 70 здоровых доноров, представителей казахской популяционной группы, проживающих в г. Астрахани и Астраханской области.

Геномную ДНК выделяли из периферической крови методом высаливания по стандартной процедуре. Генотипирование по генам HLA класса II (DRB1, DQA1, DQB1) проводили методом мультипраймерной ПЦР с использованием наборов HLA-ДНК-Тех («НПФ ДНК-Технология», Россия). Амплификацию выполняли на термоциклере «ДТ-96» в режиме реального времени («НПФ ДНК-Технология», Россия). Статистическая обработка данных включала: определение частот генов локусов DRB1, DQA1, DQB1 и гаплотипов DRB1-DQA1-DQB1 методом максимального правдоподобия. Статистическую оценку HLA-ассоциаций с различными формами лепры проводили по показателям относительного риска (RR), достоверность ассоциаций определяли по точному двустороннему критерию Фишера.

В результате проведенного исследования у больных лепрой русской популяционной группы независимо от формы заболевания установлена положительная ассоциация с гаплотипом DRB1\*16-DQA1\*0102-DQB1\*0502/04. У больных с МВ лепрой RR=3,40 ( $p<0,05$ ), а у больных с РВ формой лепры RR=4,60 ( $p<0,01$ ). Кроме того для больных с МВ формой заболевания характерно повышение частоты встречаемости и гаплотипа DRB1\*15-DQA1\*0102-DQB1\*0602/08 (RR=1,5;



$p < 0,05$ ). У больных с РВ лепрой заболевание ассоциируется с гаплотипами DRB1\*01-DQA1\*0101-DQB1\*0501 (RR=2,01;  $p < 0,05$ ) и DRB1\*04-DQA1\*0301-DQB1\*0302 (RR=3,14;  $p < 0,05$ ). Отрицательная ассоциация у РВ больных отмечалась с гаплотипом DRB1\*11-DQA1\*0501-DQB1\*0301 (RR=0,50,  $p < 0,05$ ), а у МВ больных – с гаплотипом DRB1\*07-DQA1\*0201-DQB1\*0201 (RR=0,56;  $p < 0,01$ ).

В казахской популяционной группе у больных с МВ формой лепры установлено увеличение частоты встречаемости гаплотипов DRB1\*17-DQA1\*0501-DQB1\*0201 (RR=3,40;  $p < 0,05$ ) и DRB1\*15-DQA1\*0102-DQB1\*0602/08 (RR=2,24;  $p < 0,05$ ). При РВ лепре отмечалось увеличение частоты гаплотипа DRB1\*01-DQA1\*0101-DQB1\*0501 (RR=2,90;  $p < 0,05$ ). Гаплотип DRB1\*04-DQA1\*0301-DQB1\*0305 встречался только у больных с МВ лепрой ( $p < 0,05$ ), а гаплотип DRB1\*16-DQA1\*0102-DQB1\*0502/04 только у РВ больных ( $p < 0,05$ ).

Ведущая роль системы HLA в регуляции иммунного ответа дает основание полагать, что индивидуальные и популяционные различия в HLA-гаплотипах определяют многообразие спектра иммунных реакций, характерных для различных форм лепрозного процесса, что, в конечном счете, и определяет их патогенетическое значение. В результате проведенных иммуногенетических исследований выявлены HLA-маркеры предрасположенности к развитию различных клинических форм лепры. Эти маркеры характерны для каждой конкретной этнической популяции, хотя существуют и маркеры, определяющие клиническое течение лепры независимо от этнической принадлежности больного. В этом смысле гаплотип DRB1\*01-DQA1\*0101-DQB1\*0501 ассоциирован с РВ формой, а гаплотип DRB1\*15-DQA1\*0102-DQB1\*0602/08 с развитием более тяжелой МВ формы лепры как в русской, так и в казахской популяционных группах.

Soebono с коллегами [2], изучая индонезийско-японскую этническую группу также обнаружили ассоциацию DRB1-02 специфичности с развитием МВ формы лепры. Rani с коллегами в северной Индии [3] нашли достоверное увеличение частоты встречаемости DRB1\*1501, DRB5\*0101 аллелей и снижение DQB1\*0201 аллели у больных этой же формой болезни по сравнению с РВ лепрой. Основываясь на анализе результатов популяционных

исследований, проведенных в различных регионах мира можно сделать заключение, что, несмотря на все многообразие и противоречивость данных по иммуногенетическим маркерам различных клинических форм лепры в большинстве популяций преобладают ассоциации со специфичностью DR2 и ее аллельными вариантами. При этом следует учитывать, что в подавляющем большинстве работ акцент делался на поиске ассоциаций между отдельными аллелями локусов DR и DQ с формами лепры. Однако более выраженные (и, вероятно, точные) различия можно найти при использовании трехлокусных гаплотипов DRB1-DQA1-DQB1, так как число возможных (и выявленных) вариантов трехлокусных гаплотипов значительно больше, чем число вариантов одного гена. Кроме того, в литературе имеются данные об ассоциации этой аллели и гаплотипа не только с лепрой, но и другими инфекционными заболеваниями [4, 5]. Учитывая тот факт, что с одними и теми же гаплотипами HLA ассоциирована чувствительность к различным инфекционным агентам, логично предположить, что подобного рода ассоциации могут быть связаны не только с самим генетически обусловленным реагированием на конкретный инфекционный агент, но и с конкретными звеньями, как адаптивного, так и врожденного иммунного ответа, которые принимают участие в его реализации.

Генетически детерминированный иммунный ответ не меняется в течение жизни, поэтому иммуногенетические особенности организма определяют возможное начало, течение и исход заболевания. Выявление специфичностей генов HLA-II класса (DRB1, DQA1, DQB1) и гаплотипов у больных лепрой может служить иммуногенетическими критериями прогноза течения заболевания.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Choudhuri K. // Int. J. Lepr.– 1995.– Vol.63 (3).– P.430-447.
2. Soebono H., Giphart M.I., Schreuder G.M. et al. // Int. J. Lepr.–1997.– Vol. 65 (2) – P.190-196.
3. Rani R., Fernandez-Vina M.A., Zaheer S.A. et al. // Tiss. Antigens.– 1993.– Vol.42.– P. 133-137.
4. Cervantes J., Lema C., Valentina Hurtado L., et al. // Hum. Immunol.– 2003.– Vol.64.– P. 890-895.
5. Park M.H., Song E.Y., Ahn C. et al. // Tiss. Antigens.– 2003.– Vol.62.– P.505-511.

## IMMUNOGENETIC MARKERS OF MULTIBACILLARY AND PAUCIBACILLARY LEPROSY

Saroyants L. V., Naumov V. Z.

*Leprosy Research Institute, Astrakhan, Russia*

In 100 multibacillary (MB), 49 paucibacillary (PB) leprosy patients and 108 donors of Russian population group, and 29 MB, 37 PB leprosy patients and 70 donors of Kazakh population group living in Astrakhan region PCR real-time genotyping of genes HLA class II (DRB1, DQA1, DQB1) was performed. It was found that, regardless of ethnicity haplotype DRB1 01-DQA1\*0101-DQB1\*0501 with the PB form, and haplotype DRB1\*15-DQA1\*0102-DQB1\*0602/08 with MB leprosy are associated both in Russian and in Kazakh population group.

*Keywords:* leprosy, genotyping, HLA, haplotypes.

## ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ АДАПТИВНОСТИ ИММУНОЛОГИЧЕСКОГО СТАТУСА У ДЕТЕЙ, ЭКСПОНИРОВАННЫХ МАРГАНЦЕМ

Кривцов А. В.<sup>1</sup>, Вдовина Н. А.<sup>1</sup>, Пирогова Е. А.<sup>1,2</sup>,  
Бубнова О. А.<sup>1,2</sup>, Дианова Д. Г.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения»; <sup>2</sup>ФГБОУ ВПО «Пермский государственный национальный исследовательский университет», Пермь, Россия

Изучены особенности специфического иммунного ответа и распределения частот генов детоксикации и иммунного ответа детского населения Пермского края в условиях поступления избыточных концентраций марганца с питьевой водой. Выявлен измененный генетический полиморфизм генов CYP1A1 (цитохром), CPOX (копропорфиногенаксидаза), MMR9 (металлопротеиназа), TP53 (транскрипционный фактор 53) прежде всего за счет гетерозиготного варианта генотипа, а также их ассоциация с контаминацией биосред марганцем и специфической сенсбилизацией.

*Ключевые слова:* полиморфизм генов, ген цитохрома, ген p53, марганец.

Иммунная система обеспечивает адаптацию организма к изменяющимся условиям окружающей среды, что реализуется у детей на уровне функционирования регуляторных систем, в основе которых лежат особенности их генетической детерминации. При этом актуально выявление характера адаптивности к действию ксеногенных химических соединений, и прежде всего металлов, связанной с особенностями генетического полиморфизма, а также компенсаторных возможностей иммунной системы, которая играет ключевую роль в поддержании постоянства внутренней среды организма.

**Цель работы** – анализ иммуногенетических маркеров у детей в условиях водной

экспозиции марганцем (на примере Пермского края).

При углубленном изучении состояния здоровья детского населения выполнено иммунологическое диагностическое и генетическое обследование 146 детей в возрасте от 3 до 7 лет (группа наблюдения), постоянно проживающих и посещающих детские сады на территории, отличающейся повышенным содержанием марганца в питьевой воде. При этом группу сравнения составили 57 детей, не подвергавшихся влиянию химического загрязнения. Группы были сопоставимы по соматической заболеваемости и этнической принадлежности.

Определение металлов (марганец) в биосредах детей осуществляли методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой на масс-спектрометре Agilent 7500<sub>cx</sub> («Agilent Technologies Inc.», США) в соответствии с методическими указаниями МУК 4.1.3161-14. Фагоцитарную активность лейкоцитов изучали с использованием формализированных эритроцитов барана. Содержание сывороточных иммуноглобулинов определяли методом радиальной иммунодиффузии по Манчини. Маркеры сенсibilизации к компонентам факторной нагрузки (содержание IgE специфического к марганцу) устанавливали методом аллергосорбентного тестирования.

Использовали вариант ПЦР в режиме реального времени с помощью флуоресцентных меток, которыми предварительно помечали используемые для реакции амплификации праймеры, и метод аллельной дискриминации. Различия между гетерозиготами, гомозиготами дикого и минорного вариантов устанавливают по различиям в протекании реакций амплификации соответствующих праймеров. В ходе исследования проводили изучение полиморфизма следующих патогномичных генов – CYP1A1 (цитохром), CPOX (копропорфиногеноксидаза), MMP9 (металлопротеиназа), TP53 (транскрипционный фактор 53).

Обработка данных по генотипированию проводилась с использованием унифицированной программы «Ген Эксперт».

**Результаты.** Были проведены натурные исследования по определению качественного состава питьевой воды. На территории наблюдения качество питьевой воды по гигиеническим показателям не соответствовало установленным требованиям. В результате изучения экспозиции марганца в питьевой воде выявлено превышение установленных нормативов содержания марганца (от 1,72 до 2,01 ПДК). Химико-аналитическое исследование выявило, что среднее содержание в биосредах детей марганца в 1,3 раза (54% проб) достоверно выше, чем в крови детей территории сравнения ( $p < 0,05$ ).

Данные клинко-лабораторных исследований показали наличие существенных сдвигов в функционировании иммунной системы. Так, в группе обследованных детей наблюдалось уменьшение активности со стороны врожденного клеточного иммунитета. Показатели фагоцитоза были достоверно снижены у 62,1% детей по сравнению с референтным диапазо-

ном, а также относительно группы сравнения в 62,9% случаев ( $p < 0,05$ ). Анализ отношения шансов изменения показателей иммунитета при возрастании концентрации контаминантов в биологических средах позволил установить достоверное понижение маркеров фагоцитарной активности при увеличении концентрации марганца в крови ( $R_2 = 0,25 - 0,38$  при  $p < 0,05$ ).

Маркеры специфической сенсibilизации к компонентам факторной нагрузки специфический (IgE к марганцу) находились на достоверно более высоком уровне относительно референтного диапазона (в 19,6% случаев), различия достоверны по критерию кратности превышения нормы ( $p < 0,05$ ). Анализ отношения шансов изменения специфического ответа при возрастании концентрации контаминантов в биосредах позволил установить достоверное повышение концентрации IgE к марганцу при возрастании концентрации марганца в крови ( $R^2 = 0,28$ , при  $p < 0,05$ ).

Генотипирование предрасположенности к нарушениям запрограммированной клеточной гибели и онкопролиферативным состояниям по гену матриксной металлопротеиназы-9 (MMP9) и гену TP53, кодирующему белок p53, показало достоверные различия между обследованными группами. В то же время анализ полиморфизма генов 1 и 2 фазы детоксикации ксенобиотиков – гена цитохрома P-450 CYP1A1 и гена копропорфиногеноксидазы CPOX выявил специфические различия между изучаемыми группами. Распространенность патологического аллеля CYP1A1, отвечающего за 1 фазу детоксикации, у детей группы наблюдения превышала контрольную в 5,3 раза, частота встречаемости составила 66% против 3% в группе сравнения.

Таким образом, у детей, проживающих в зоне загрязнения питьевой воды марганцем, наблюдались супрессорные реакции со стороны иммунной системы в сочетании с повышенной чувствительностью к компонентам факторной нагрузки (IgE специфический к марганцу), а также генетическими нарушениями системы детоксикации ксенобиотиков (CYP1A1), запрограммированной клеточной гибели (TP53) и онкопролиферации (MMP9).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Долгих О.В., Кривцов А.В., Харахорина Р.А., Ланин Д.В. Вестник Уральской медицинской академической науки. 2012,4, 240-241.

2. Предеина Р.А., Долгих О.В., Сеницына О.О. Здоровье населения и среда обитания, 2013,11 (248), 30-32
3. Zaitseva N. V., Dianova D. G., Dolgikh O. V. European journal of natural history. – 2014. – № 1. – С. 7–8
1. Dolgikh O., Zaitseva N., Dianova D., Krivtsov A. Molecular markers of apoptosis in industrial workers // In vivo: international Journal of Experimental and Clinical Pathophysiology and Drug Research. 2011. – Vol. 25. – № 3. – P. 523-524

## GENETIC FEATURES OF ADAPTIVE IMMUNOLOGICAL STATUS IN CHILDREN EXPOSED TO MANGANESE

**Krivtsov A. V.<sup>1</sup>, Vdovina N. A.<sup>1</sup>, Pirogova E. A.<sup>1,2</sup>,  
Bubnova O. A.<sup>1,2</sup>, Dianova D. G.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>FBSI «Federal Scientific Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies»;

<sup>2</sup> FSBEI HPE «Perm State National Research University», Perm, Russia

The features of the specific immune response and the frequency distribution of genes detoxification and immune response of the child population of the Perm region under conditions of the exposure to the excess manganese concentrations in drinking water have been studied. The changed genetic polymorphism of genes CYP1A1 (cytochrome), CPOX (Coproporphyrinogens oxidase), MMP 9 (metalloproteinase), TP53 (a transcription factor 53) has been revealed primarily due to the heterozygous variant of genotype as well as their association with biological media contamination with manganese and specific sensibilization.

*Key words:* gene polymorphism, cytochrome gene, p53 gene, manganese.

## РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ГЕНОВ HLA-DQA1, DQB1 У БОЛЬНЫХ НЕСПЕЦИФИЧЕСКИМ ЯЗВЕННЫМ КОЛИТОМ РУССКОЙ ПОПУЛЯЦИИ ЧЕЛЯБИНСКОЙ ОБЛАСТИ

**Сташкевич Д. С.<sup>1</sup>, Складчикова А. О.<sup>1</sup>, Беяева С. В.<sup>1,2</sup>,  
Сулова Т. А.<sup>1,2</sup>, Василенко А. Г.<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Челябинский государственный университет; <sup>2</sup>Челябинская станция переливания крови; <sup>3</sup>Челябинская областная клиническая больница, Челябинск, Россия

Цель: определить частоты встречаемости генов локусов HLA-DQA1, DQB1 у больных неспецифическим язвенным колитом русской популяции Челябинской области. Основной метод исследования – ПЦР с сиквенс специфическими праймерами. Установлены особенности распределения генов HLA-DQA1, DQB1 у больных НЯК. Можно предположить, что гены HLA DQA1\*01:02, HLA DQA1\*01:03, HLA DQB1\*06:02-8 могут являться маркерами предрасположенности к неспецифическому язвенному колиту у русских Челябинской области.

*Ключевые слова:* HLA, неспецифический язвенный колит, HLA-DQ.

**Введение.** Неспецифический язвенный колит (НЯК) является хроническим, рецидивирующим, иммунологически опосредованным воспалительным заболеванием, которое входит в группу воспалительных заболеваний кишечника – IBD (inflammatory bowel disease)

[1]. Согласно сложившейся в настоящее время рабочей гипотезе в основе патогенеза НЯК лежит неадекватный иммунный ответ слизистой кишечника на кишечную микробиоту у генетически восприимчивых индивидуумов [1]. Несмотря на наличие убедительных

доказательств о существовании генетической предрасположенности к данной патологии, до сих пор ведутся исследования по поиску генов-кандидатов НЯК [1,2] Среди таких генов особое внимание можно сосредоточить на геном семействе HLA.

Система HLA представляет собой мультигенное семейство, включающее в себя 230 локусов. По направлению от теломеры к центромере выделяют регионы I, III и II классов, характеризующиеся необычным полиморфизмом. Среди HLA II класса наиболее изучаемыми являются гены DRB1, DQA1, DQB1, кодирующие  $\beta$ - и  $\alpha$ -цепи соответствующих белковых продуктов, принимающих непосредственное участие в реализации иммунного ответа [3].

Ранее нами была проведена оценка частот встречаемости специфичностей HLA-DRB1 у больных неспецифическим язвенным колитом, в продолжение исследования изучено распределение генов HLA-DQA1, DQB1.

**Цель:** определить частоты встречаемости генов локусов HLA-DQA1, DQB1 у больных неспецифическим язвенным колитом русской популяции Челябинской области.

**Материалы и методы.** Группа больных НЯК – 73 человека. Набор больных осуществлялся случайным образом в гастроэнтерологическом отделении Областной клинической больницы с 2013 по 2014 гг. В качестве группы сравнения использовались потенциальные доноры костного мозга русской популяции Челябинской области из регистра ГБУЗ «Челябинской областной станции переливания крови» (207 человек).

Распределение частот генов HLA DQA1, DQB1 в группе практически здоровых лиц русской популяции Челябинской области было установлено в исследовании, поддержанном грантом РФФИ (№ 15–04–05176). Принадлежность к популяционной группе определялась по данным генеалогического анамнеза до третьего поколения (согласно рекомендациям 8-го Международного Симпозиума в 1980 г., Лос-Анджелес, США). В качестве биологического материала для исследования использовалась венозная кровь, взятая в пробирки с 0,5% раствором калиевой соли этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА). Выделение ДНК проводили с использованием реагентов PROTRANS DNA Box 500. Опреде-

ление полиморфизма генов HLA проводилось методом молекулярного типирования – PCR SSP наборами реагентов Protrans (Protrans, Germany) с последующей визуализацией ампликонов в УФ свете. Статистическая обработка проводилась с помощью точного двухстороннего критерия Фишера. Во всех случаях различия считали статистически значимыми при  $p \leq 0,05$ , незначимыми при  $p > 0,10$ ; для промежуточных значений  $p$  ( $0,05 \leq p \leq 0,10$ ) обсуждали тенденцию к различиям. Для оценки вероятности развития предрасположенности/устойчивости к НЯК в зависимости от носительства определенного гена локусов HLA-DQA1, -DQB1 использовали процедуру расчета критерия отношения шансов (OR) и 95% доверительного интервала (CI).

**Результаты.** Установлено, что распределение генов локусов HLA DQA1, DQB1 у больных неспецифическим язвенным колитом русской популяции имело следующие особенности. В группе больных повышены частоты специфичностей HLA DQA1\*01:02 ( $p=0,034$ ) и HLA DQA1\*01:03 ( $p=0,03$ ). Носительство таких генов повышает вероятность развития НЯК в 1,82 (95% CI 1,05–3,15) и 1,98 (95% CI 1,08–3,64) раз соответственно. Кроме того, выборка больных характеризовалась повышенной частотой генов HLA DQB1\*06:02-8 ( $p=0,0015$ ). Согласно критерию отношения шансов (OR) вероятность развития НЯК у носителей HLA DQB1\*06:02–8 возрастает в 2,45 раз (95% CI 1,42–4,26).

Выявлено отсутствие носителей гена HLA DQA1\*04:01 у больных НЯК ( $p=0,024$ ), что можно объяснить его низкой частотой встречаемости в русской популяции.

Таким образом, можно предположить, что гены HLA DQA1\*01:02, HLA DQA1\*01:03, HLA DQB1\*06:02-8 могут являться маркерами предрасположенности к неспецифическому язвенному колиту у русских Челябинской области.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Thompson A. I., Lees C. W. // Basic Science Review. – 2011. – Vol. 17. – P.831-847.
2. Karlsen T. H., Boberg K. M., Vatn M. et al. // Genes and Immunity. – 2007. Vol. 8. – P. 275-278.
3. Bouzid D., Kammoun A., Amouri A. et al. // Genet. Test. Mol. Biomarkers. – 2012. – Vol.16 (6). – P.482-487.

## THE DISTRIBUTION OF GENES HLA-DQA1, DQB1 IN PATIENTS WITH ULCERATIVE COLITIS OF RUSSIAN POPULATION OF CHELYABINSK REGION

<sup>1</sup>Stashkevich D.S., <sup>1</sup>Skladchikova A.O., <sup>1,2</sup>Belyaeva S.V.,  
<sup>1,2</sup>Suslova T.A., <sup>3</sup>Vasilenko A.G.

<sup>1</sup>Chelyabinsk State University; <sup>2</sup>Chelyabinsk blood transfusion station;  
<sup>3</sup>Chelyabinsk Regional Hospital, Chelyabinsk, Russia

Objective: To determine the genes' frequency of loci HLA-DQA1, DQB1 in patients with ulcerative colitis of Russian population of the Chelyabinsk region. The main method of research – PCR SSP. The features of the distribution of genes HLA-DQA1, DQB1 in patients with ulcerative colitis are established. It can be assumed that the genes HLA DQA1 \* 01: 02, HLA DQA1 \* 01: 03, HLA DQB1 \* 06: 02–8 may be markers of susceptibility to ulcerative colitis in Russian Chelyabinsk region.

*Keywords:* HLA, ulcerative colitis, HLA-DQ.

## ВЛИЯНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА С3435Т ГЕНА MDR1 НА ГЕПАТОТОКСИЧНОСТЬ И ЭФФЕКТИВНОСТЬ ТЕРАПИИ МЕТОТРЕКСАТОМ У БОЛЬНЫХ С РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ

Ходус Е. А.<sup>1</sup>, Девальд И. В.<sup>1</sup>, Бурмистрова А. Л.<sup>2</sup>,  
Хромова Е. Б.<sup>2</sup>, Пинчук А. С.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>МБУЗ ОТКЗ Городская клиническая больница № 1; <sup>2</sup>ФГБОУ ВПО «Челябинский  
государственный университет», Челябинск, Россия

Проведено исследование полиморфизма гена MDR1 С3435Т у пациентов с ревматоидным артритом, получавших в качестве базисного противовоспалительного препарата метотрексат в дозах от 10 до 15 мг/нед. Проведена оценка эффективности терапии метотрексатом, в зависимости от степени активности заболевания и наличия гепатотоксичности через 6 мес и через 1 год от начала терапии. Было установлено, что полиморфизм С3435 гена MDR1 ассоциирован с проявлением гепатотоксичности на терапию метотрексатом, но не с эффективностью терапии.

*Ключевые слова:* ревматоидный артрит, метотрексат, ген, MDR1.

Ревматоидный артрит (РА) – одно из распространенных (около 1% населения земного шара) аутоиммунное ревматическое заболевание, характеризующееся симметричным эрозивным артритом с формированием активно пролиферирующей воспалительной ткани – паннуса и широким спектром внесуставных (системных) проявлений. Характерные клинические признаки РА – боль, нарушение функции, прогрессирующая деформация суставов, поражение внутренних органов (амилоидоз), приводящие к ранней потере трудоспособ-

ности (около 1/3 пациентов становятся инвалидами в течение 20 лет от начала болезни) и сокращению продолжительности жизни пациентов (в среднем на 5–15 лет). Преждевременная летальность во многом связана с высокой частотой сопутствующих заболеваний (инфекции, ранний атеросклероз и артериальная гипертензия, остеопоретические переломы костей скелета и др.) [1].

В ревматологии существует такое понятие, как «терапевтическое окно» или «окно возможностей», которое представляет собой ран-

ний период течения заболевания (несколько месяцев от появления клинической симптоматики). Задача врача-ревматолога состоит в достижении наилучших отдаленных прогнозов в течении РА, в связи с чем необходимо, в вышеуказанный период назначить базисную противовоспалительную терапию. Ранний и непрерывный прием базисных препаратов под наблюдением врача приводит к предотвращению деструкции и деформации суставов, уменьшению клинической симптоматики (боль и скованность), а также к увеличению продолжительности жизни и трудоспособности пациентов.

К «золотому стандарту» терапии РА относится – метотрексат (МТ). Он является основным компонентом лечения РА и должен быть назначен каждому пациенту с таким диагнозом, при отсутствии определенного ряда противопоказаний. МТ представляет собой антиметаболит фолиевой кислоты, который обладает цитотоксическим действием и назначается больным с РА в средних дозах 10–15 мг в неделю. Основная цель регулярного приема МТ достичь контроля клинической и лабораторной активности заболевания. Активность течения заболевания у пациентов с РА можно оценить при помощи специального индекса – DAS 28, который включает в себя подсчет числа припухших и болезненных суставов (из 28 возможных), уровень СОЭ или СРБ, оценку боли по визуальной аналоговой шкале (ВАШ).

Согласно литературным данным, эффективность терапии МТ у больных ревматоидным артритом связана с наличием определенных аллельных вариантов и генотипов в точке С3435Т гена MDR1 (Multiple Drug Resistance – множественной лекарственной устойчивости). Продукт MDR1 гена – Р-гликопротеин (Р-gp), который действует как энергозависимый насос выкачивая из клетки против концентрационного градиента разнообразные цитотоксические соединения [2].

По данным исследования J. Chen, проведенном в 2011 среди взрослых китайцев с РА MDR1-генный полиморфизм С3435Т может влиять на эффективность терапии заболевания основным базисным противовоспалительным препаратом – МТ. Обнаружена связь между генотипом СС гена MDR1 и неэффективностью терапии РА. В нашей стране оценка влияния полиморфизма С3435Т на эффективность терапии МТ была проведена в 2013 году

у пациентов с ювенильным идиопатическим артритом (ЮИА). Исследование было выполнено Ф.В. Рохлиной и соавторами с участием 103 пациентов с ЮИА, получающих терапию МТ в дозе 15 мг/м<sup>2</sup> и 26 условно здоровыми детьми в возрасте до 17 лет. В ходе исследования было установлено, что полиморфизм С3435Т гена MDR1 влияет на эффективность терапии. У больных ЮИА с генотипом ТТ заболевание может протекать с более высокой воспалительной активностью, по сравнению с детьми, имеющих генотипы СС и СТ [3].

Несмотря на достаточное количество исследований посвященных изучению полиморфизма гена MDR1 С3435Т (преимущественно зарубежных), результаты остаются противоречивыми и требуют дальнейших доказательств.

**Цель исследования:** определение связи полиморфизма С3435Т гена MDR1 с эффективностью и гепатотоксичностью метотрексата у пациентов с РА.

**Материалы и методы.** В исследование было включен 41 пациент с РА, в возрасте от 28 до 77 лет, средний возраст составил 53,8 лет, из них 10 мужчин (24%) и 31 женщина (76%), находившихся на лечении в ревматологических отделениях г. Челябинска в период с 2012 по 2014 годы. Набор больных проводился вне зависимости от возраста, степени активности и стадии заболевания, при условии отсутствия ранее какой-либо БПВТ не только МТ, но и другими лекарственными препаратами. У всех пациентов были исключены другие заболевания аутоиммунной этиологии. Оценка эффективности терапии МТ проводилась через 6 месяцев и через 1 год и оценивалась на основании динамики индекса DAS28 (число болезненных и припухших суставов, уровень СОЭ или СРБ, оценка боли по визуальной аналоговой шкале). Полиморфизм гена MDR1 С3435Т определяли методом PCR-RFLP.

**Результаты.** На фоне проводимой терапии МТ мы выделили две группы пациентов: с высокой («ответчики») и низкой («неответчики») эффективностью лечения. В группу «ответчиков» вошли 22 человека (54%), в группу «неответчиков» – 19 человек (46%). Сравнительный анализ частоты встречаемости аллелей гена MDR1 С3435Т в группах с разной эффективностью терапии показал, что частота аллеля Т практически не различается в группе «ответчиков» и «неответчиков» (50,00% и 55,26% соответственно). Частота аллеля С,

также существенно не различается в этих двух группах: 50,00% в группе пациентов с высокой эффективностью терапии и 44,74% в группе пациентов с низкой эффективностью лечения. Достоверных различий в частоте встречаемости генотипов СС, СТ, ТТ гена MDR1 в двух вышеуказанных группах больных не получено, разница процентных соотношений также невелика: генотип ТТ – 18,18% в группе «ответчиков» и 10,53% в группе «неответчиков», генотип СТ – 63,64% и 68,42% соответственно, генотип СС – 18,18% и 21,05% соответственно. По литературным данным генотипы ТТ и СТ связаны с более низкой эффективностью базисного лечения МТ в связи с повышенным выведением лекарственного препарата из клетки. Возможно, что мы не получили достоверных различий с учетом малой выборки пациентов. В продолжение нашего исследования мы попытались обнаружить взаимосвязь полиморфизма гена MDR1 C3435T с гепатотоксичностью МТ, которая по литературным данным ассоциируется с генотипами СТ и СС. Из всех пациентов, получающих терапию МТ, мы выделили группу больных с гепатотоксическими проявлениями (повышение уровня АСТ и АЛТ) – 8 пациентов (19%) и без них – 33 пациента (81%). В ходе анализа частоты встречаемости аллелей гена MDR1 C3435T между этими группами больных мы получили следующие данные: аллель Т чаще встречается у пациентов без гепатотоксических явлений,

чем с ними – 54,55% и 43,75% соответственно, напротив аллель С чаще обнаружена у пациентов именно с гепатотоксичностью – 56,25% против 45,46%. Рассматривая частоты встречаемости генотипов мы определили, что генотип ТТ чаще встречается у пациентов без повышения уровня трансаминаз – 21,21%, против 12,50% в группе с проявлениями гепатотоксичности. Существенной разницы в частоте генотипа СТ нами получено не было, у пациентов с гепатотоксичностью – 62,50%, без нее – 66,67%, а вот частота генотипа СС выше в группе больных с токсическими проявлениями со стороны печени, что совпадает с литературными данными: 25,00% против 12,12% в группе больных без явлений гепатотоксичности.

Таким образом, было установлено, что полиморфизм C3435 гена MDR1 ассоциирован с проявлением гепатотоксичности на терапию метотрексатом, но не с эффективностью лечения.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Насонов Е. Л. Ревматология: национальное руководство / Е. Л. Насонов, Д. Е. Каратеев, Р. М. Балабанова. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. – С. 290-331.
2. Takatori R., Takahashi K. A. // *Clinical and Experimental Rheumatology*. – 2006. – № 24. – Pp. 546-554.
3. Рохлина Ф. В. // *Педиатрическая фармакология*. – 2013. – № 10. – С. 46-51.

#### INFLUENCE POLYMORPHISM C3435T OF THE GENE MDR1 ON THE HEPATOTOXICITY AND EFFICACY OF TREATMENT OF METHOTREXATE IN PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS

Khodus E. A.<sup>1</sup>, Devald I. V.<sup>1</sup>, Khromova E. B.<sup>2</sup>,  
Burmistrova A. L.<sup>2</sup>, Pinchuk A. S.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Municipal Clinical Hospital № 1; <sup>2</sup>Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russia

A study of polymorphism C3435T MDR1 gene in patients with rheumatoid arthritis, which as a basic anti-inflammatory drug for the treatment of diseases appointed methotrexate in doses of 10 to 15 mg/week. Assessed the effectiveness of methotrexate therapy, depending on the degree of disease activity and the presence of hepatotoxicity after 6 months and after 1 year of therapy. It was found that the gene polymorphism C3435T MDR1 expression of hepatotoxicity associated with methotrexate therapy, but not with efficacy.



## ВЛИЯНИЕ СОЦИАЛЬНОГО СТРЕССА НА ЭКСПРЕССИЮ мРНК ГЕНОВ ГЛЮКОКОРТИКОИДНЫХ NR3C1 И ADR $\beta$ 2-РЕЦЕПТОРОВ В КИШЕЧНО-АССОЦИИРОВАННОЙ ЛИМФОИДНОЙ ТКАНИ

Топол И. А., Камышный А. М.

*Запорожский государственный медицинский университет,  
Запорожье, Украина*

В эксперименте исследовалось влияние хронического социального стресса на уровень экспрессии мРНК Nr3c1 и Adr $\beta$ 2-рецепторов иммунными клетками КАЛТ у крыс. Выделение тотальной РНК проводили с помощью “Trizol RNA Prep100” (Изоген, Россия); для проведения обратной транскрипции и получения кДНК использовали набор ОТ-1 “Синтол” (Россия). Для определения уровня экспрессии мРНК генов Nr3c1 и Adr $\beta$ 2, проводили ОТ-ПЦР в реальном времени на амплификаторе CFX96™ Real-Time PCR Detection Systems («Bio-Rad Laboratories, Inc.», США). Относительный уровень экспрессии генов оценивали по методу  $\Delta\Delta C_t$ , нормализуя по референс-гену GAPDH. Установлено, что развитие ХСС приводило к значительному снижению мРНК исследуемых генов Nr3c1 и Adr $\beta$ 2 в КАЛТ крыс. Это, в свою очередь, может существенно повлиять на баланс субпопуляций Т-клеток и инициировать развитие воспалительных и аутоиммунных заболеваний.

*Ключевые слова:* хронический социальный стресс, Nr3c1, Adr $\beta$ 2.

Хронический социальный стресс (ХСС) является неотъемлемой частью современной жизни. Стресс-индуцированная иммунная дисрегуляция приводит к значительным негативным последствиям для здоровья, увеличивая риск развития вирусных инфекций, хронических аутоиммунных и воспалительных заболеваний. Так, во многих клинических и экспериментальных исследованиях было показано, что ХСС может быть триггером развития патологических состояний, включая сахарный диабет 1 типа и воспалительные заболевания кишечника (ВЗК). В свою очередь, главными эффекторными гормонами во время стресс-реакции являются глюкокортикоиды (ГК) и катехоламины (КХ), а изменения уровня экспрессии их рецепторов Nr3c1 и Adr $\beta$ 2 могут приводить к резистентности к ГК и КХ и объяснить преобладание провоспалительной сигнализации в условиях ХСС вопреки классической парадигме стресса. Известно, что иммунные клетки имеют рецепторы к ГК и КХ, и благодаря этому обстоятельству возможно прямое влияние этих гормонов на функциональные элементы как врожденного, так и адаптивного иммунитета

и их участие в регуляции иммунного ответа в условиях ХСС [1, 2]. Кроме того, Nr3c1 может функционировать как транскрипционный фактор и связываться со специфическими, чувствительными к ГК участками ДНК (glucocorticoid-responsible elements, GRE), расположенными в промоторных областях генов и активировать их транскрипцию, так и в качестве регулятора активности других транскрипционных факторов [1]. Поэтому целью данного исследования было изучение экспрессии мРНК Nr3c1 и Adr $\beta$ 2 в КАЛТ в условиях ХСС у крыс линии Wistar.

**Материалы и методы.** Исследования проводились на 45 самках крыс линии Wistar, которые были разделены на 3 экспериментальных группы: контрольные крысы (группа 1); крысы, которым моделировали ХСС1 путем трехнедельной социальной изоляции и длительного психоэмоционального воздействия (группа 2); крысы, которым моделировали ХСС2 путем содержания животных в перенаселенных клетках в течение 3 недель с ежедневным изменением группировки (группа 3). Объектом исследования у экспериментальных животных были сгруппированные лим-

фоидные узелки подвздошной кишки. РНК получали из гистологических срезов толщиной 15 мкм, для этого проводили их депарфинизацию в ксилоле и регидратацию в нисходящих концентрациях этанола. Выделение тотальной РНК проводили с использованием «Trizol RNA Prep100» (Изоген, Россия). Для проведения обратной транскрипции и получения кДНК использовали набор ОТ-1 фирмы «Синтол» (Россия). Реакционная смесь общим объемом 25 мкл содержала 1 мкл Random-6 праймера, 2 мкл тотальной РНК, 8,5 мкл dH<sub>2</sub>O, 12,5 мкл 2,5x реакционной смеси и 1 мкл ревертазы MMLV-RT. Определяли уровень экспрессии исследуемых генов с помощью амплификатора CFX96™ Real-Time PCR Detection Systems («Bio-Rad Laboratories, Inc.», США) и набора реактивов Maxima SYBR Green/ROX qPCR MasterMix (2X) (ThermoScientific, США). Специфические пары праймеров для анализа исследуемых и референтного генов были подобраны с помощью программного обеспечения PrimerBlast ([www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast)) и изготовлены фирмой Metabion (Германия). После начальной денатурации в течение 10 мин при 95 °С амплификация состояла из 45-50 циклов и проводилась при следующих условиях: денатурация – 95 °С, 15 сек., отжиг – 59–61 °С, 30-60 сек., элонгация – 72 °С, 30 сек. В качестве референс-гена был использован ген глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (GAPDH). Относительное нормализованное количество кДНК целевых генов определяли методом  $\Delta\Delta Ct$ . Статистический анализ данных ПЦР проводили при помощи программного обеспечения CFX Manager™ (Bio-Rad, США).

**Результаты и обсуждение.** Исследование экспрессии Nr3c1 и Adrβ2 в КАЛТ подвздошной кишки показало, что развитие ХСС приводило к значительному снижению содержания мРНК исследуемых генов (Nr3c1 – в 3,1 раза ( $p < 0,05$ ) при ХСС1 и в 10 раз ( $p < 0,01$ ) на фоне ХСС2; Adrβ2 – в 12,5 раз ( $p < 0,02$ ) при ХСС1 и в 10,1 раз ( $p < 0,01$ ) в случае ХСС2) по сравнению с контрольной группой крыс. Возможными причинами развития резистентности к ГК в условиях ХСС являются: 1) снижение уровня экспрессии мРНК Nr3c1; 2) генетический полиморфизм гена Nr3c1, приводящий к замедлению транслокации рецептора в ядро, снижение его аффинности к гормону и/или коактиваторам, нестабильности ГК-рецептора, снижение его трансактивационной активнос-

сти и др.; 3) нарушение формирования комплекса ГР через изменения экспрессии шаперонов и ко-шаперонов, таких как Hsp90, Hsp70, Hsp56, иммуномодулин, импортин IPO13, FKBP51 и FKBP52, а также полиморфизм их генов; 4) эпигенетические изменения уровня экспрессии мРНК ДНК-метилтрансфераз 3a-3b, гистон-деацетилазы 2 HDAC2, целого ряда микро-РНК [3, 4]. Эти причины могут нивелировать иммуносупрессивные эффекты ГК, усиливать про-воспалительную сигнализацию в кишечнике и индуцировать резистентность к ГК. Так, известно, что около 20% больных с ВЗК резистентны к действию ГК, что вызвано, по крайней мере, несколькими механизмами: 1) гиперэкспрессией регулирующего мембранный транспорт Р-гликопротеина (P-gp) лимфоцитами и эпителиоцитами кишечника, 2) конститутивной активацией эпителиоцитов провоспалительными медиаторами и стимуляцией NF-κB, что приводит к ингибированию транскрипционной активности ГР [4]. Таким образом, может формироваться “порочный круг” – развивающаяся при ХСС резистентность к ГК приводит к развитию воспаления в кишечнике, а это еще в большей мере усиливает “толерантность” рецепторов к ГК. Полученные нами данные подтверждаются целым рядом других исследований. Так, применение различных экспериментальных моделей ХСС показало, что он может вызвать генерацию и выход незрелых, провоспалительных миелоидных клеток, которые являются нечувствительными к эффектам ГК. Так, Jung S. et al., (2015) установил, что экспрессия мРНК ГК-рецепторов была значительно уменьшена в макрофагах селезенки при ХСС. Стресс также индуцирует значительное снижение экспрессии мРНК иммунофилина FKBP52 [3]. Кроме того, в условиях ХСС отмечалось значительное снижение экспрессии мРНК ДНК-метилтрансфераз 3a и 3b, HDAC2 и количества метилированной ДНК в макрофагах селезенки. Определение профиля микроРНК показало, что стресс вызывал значительное повышение экспрессии 9 различных микроРНК, 6 из которых взаимодействуют с мРНК ГК-рецепторов, 3 – с мРНК минералокортикоидных рецепторов и 2 – с мРНК иммунофилина FKBP52.

Не менее важными эффекторными гормонами во время стресс-реакции являются КХ, а Т- и В-лимфоциты активно экспрессируют

$\beta$ 2-адренорецепторы ( $\beta$ 2AR) на разных стадиях дифференцировки. Так, Sanders V.M. et al. (2012) было установлено, что активация  $\beta$ 2AR нарушает дифференцировку, пролиферацию и функции Th1-клеток в результате повышения концентрации цАМФ в лимфоцитах, что приводит к ингибированию пролиферации Т-клеток и снижению продукции IL-2, IL-12, TNF- $\alpha$  и IFN- $\gamma$  и стимулирует выработку IL-10 и TGF- $\beta$  [2]. С другой стороны, на локальном уровне КХ могут усиливать региональный иммунный ответ, индуцируя продукцию IL-1, TNF $\alpha$  и IL-8. Т-регуляторные лимфоциты (Treg) экспрессируют тирозингидроксилазы – ферменты, ограничивающие скорость синтеза КХ, а высвобождение КХ приводит к снижению продукции IL-10 и TGF- $\beta$  Treg клетками, и к уменьшению Treg-зависимого ингибирования эффекторных Т-лимфоцитов. В исследованиях Guerreschi M. G. et al. (2013) было обнаружено, что передача сигналов через  $\beta$ 2AR усиливала супрессорную актив-

ность Treg *in vitro*, способствовала конверсии Foxp3-клеток в Foxp3<sup>+</sup>индуцибельные iTreg клетки. Кроме того, в Treg  $\beta$ 2AR сигнализация увеличивала экспрессию негативной ко-стимуляторной молекулы CTLA-4 [5]. Поэтому, обнаруженное нами в работе снижение уровня экспрессии мРНК  $\beta$ 2AR может частично объяснить причину дефицита супрессорной сигнализации, помимо резистентности к ГК.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Meijnsing S. H. et al. // Science. – 2009. – Vol. 324. – P. 407-410.
2. Sanders M. // BrainBehav Immun. – 2012. – Vol. 26. – P. 195-200.
3. Jung S. et al. // Brain Behav Immun. – 2015 – Vol. 44. – P. 195-206.
4. Iudicibus S. et al. // World J Gastroenterol. – 2011. – Vol. 17. – P. 1095-1108.
5. Guerreschi M. G. et al. // Eur J Immunol. – 2013 – Vol. 43. – P. 1001-1012.

### IMPACT OF SOCIAL STRESS ON mRNA GENE EXPRESSION OF GLUCOCORTICOID NR3C1 AND ADR $\beta$ 2-RECEPTORS IN THE GUT-ASSOCIATED LYMPHOID TISSUE

Topol I. A., Kamyshny A. M.

Zaporozhye State Medical University, Zaporozhye, Ukraine

It was investigated the mRNA expression levels of Nr3c1 and Adr $\beta$ 2 in gut-associated lymphoid tissue (GALT) under CSS in Wistar rats. To determine the level of mRNA Nr3c1 and Adr $\beta$ 2 expression was performed RT-PCR in real-time by thermocycler CFX96™ Real-Time PCR Detection Systems («Bio-Rad Laboratories, Inc», USA). Internal standard such as rat reference gene GAPDH were used to normalise mRNA levels between Nr3c1 and Adr $\beta$ 2 for an exact comparison of mRNA transcription level. The relative level of gene expression were studied by the method  $\Delta\Delta$ Ct. Statistical analysis were conducted using available software «Bio-Rad CFX Manager 3.1» (Bio-Rad, USA). Research of Adr $\beta$ 2 and Nr3c1 expression in GALT of ileum showed that the development of CSS led to a significant decrease in mRNA content of Nr3c1 and Adr $\beta$ 2 genes in the case CSS2) compared with control group of rats. This, in turn, can significantly to influence the balance of pro-and anti-inflammatory subsets of T cells and initiate the development of IBD and AID.

*Key words:* chronic social stress, Nr3c1, Adr $\beta$ 2.



**Раздел 10**  
**ВОПРОСЫ ПРЕПОДАВАНИЯ**  
**ИММУНОЛОГИИ**

## МЕТОДИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПРЕПОДАВАНИЯ ИММУНОЛОГИИ НА КАФЕДРЕ МИКРОБИОЛОГИИ, ВИРУСОЛОГИИ, ИММУНОЛОГИИ

Ляшенко И. Э., Михайлова Е. А., Желтова В. И.,  
Киргизова С. Б., Жеребятъева О. О.

*ГБОУ ВПО «Оренбургский государственный медицинский университет»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Оренбург, Россия*

Представлены методические аспекты преподавания иммунологии на кафедре микробиологии, вирусологии, иммунологии ОрГМУ. Определено значение комплексного подхода к процессу обучения для развития мотивационной активности студентов в изучении дисциплины. Показана эффективность используемых педагогических приёмов в изучении иммунологии студентами для профессиональной дальнейшей деятельности.

*Ключевые слова:* иммунология, преподавание, профессиональные компетенции.

Изучение медицинской микробиологии, вирусологии и иммунологии осуществляется в медицинском университете в 3-4 семестрах, на раннем этапе доклинической подготовки специалиста. Это создает определенные трудности для организации учебного процесса, в том числе обусловленные особенностями современного научного знания, для которого характерны интенсивные инновационные и интеграционные процессы. Именно поэтому коллектив кафедры уделяет серьезное внимание методическому обеспечению всех форм обучения, которое рассматривается как важнейшая составляющая организации учебного процесса, дающая общую и частную ориентировочную основу конкретной педагогической деятельности.

Рабочая программа по иммунологии составлена с учетом основных общекультурных и профессиональных компетенций, которые реализуются на дисциплинах, предшествующих изучению иммунологии, на смежных теоретических фундаментальных дисциплинах, а также на кафедрах клинического профиля, в том числе инфекционных болезней, дермато-венерологии, туберкулеза, детских болезней. Понятия и процессы, привлекаемые для изучения иммунологии из других наук,

дают дидактический материал для теоретического осмысления сложной, упорядоченной системы взаимосвязей, ориентированной вокруг главных категорий дисциплины.

Основные компетенции иммунологии изучаются в контексте общих закономерностей становления и развития науки, а так же в конкретных ситуациях отдельных частных патологий микробной этиологии.

Методы преподавания соответствуют основным приемам организации учебного процесса, который включает лекционный курс, установочное собеседование на практическом занятии, контроль выполнения лабораторных исследований, контроль усвоения основных компетенций, активизацию аудиторной и внеаудиторной работы и другие.

Содержательная часть курса определяется целями, задачами и временными рамками, предусмотренными рабочей программой, профилированной в соответствии со специальностями (лечебное дело, педиатрия, стоматология, медико-профилактическое дело, фармация).

Лекционный курс предусматривает изложение фундаментальных знаний в аспекте истории развития представлений о феноменах и механизмах иммунитета с обязательной их

интерпретацией в рамках достижений современной науки. Каждая лекция сопровождается презентацией, содержащей современный иллюстративный материал, включая учебные фильмы. Лабораторные, практические работы проводятся в соответствии с методическими рекомендациями, разработанными сотрудниками кафедр. [1, 2]

Особую значимость представляет визуализация четко сформулированных принципов и методов лабораторной диагностики, специфической терапии и профилактики инфекционных заболеваний. С этой целью в каждой учебной лаборатории на фронтальной стене размещены стационарные, профессионально выполненные стенд-таблицы, содержащие сведения об общих принципах и методах диагностики. При этом, выделяется значение использования системы «антиген-антитело» как при бактериологическом, вирусологическом исследованиях, так и в процессе серологической диагностики инфекционных заболеваний. Здесь же в ряду других общих стендов-таблиц представлены сведения об основных препаратах, используемых как для диагностики, так и для специфической профилактики и терапии.

Кафедра уделяет большое внимание организации самостоятельной работы студентов по изучению иммунологии, расценивая этот вид учебной деятельности как стимул для активизации процесса изучения дисциплины.

Для оптимизации самостоятельной подготовки студентов разработана система вопросов и ответов по иммунологии, включенная в методические рекомендации для подготовки к лабораторным занятиям.

В целях ориентированности студентов на самостоятельный поиск специальной информации на кафедре используется привлечение к работе в кружке студенческого научного общества (СНО). Студентам представляется по выбору тематика рефератов и докладов, как правило, носящая гносеологический характер.

Обсуждение вопросов на заседаниях кружка носит острый дискуссионный характер, что, несомненно, привлекает студентов к дальнейшему участию в деятельности СНО уже на экспериментальном уровне, а у преподавателя появляется возможность обоснованной и четко обозначенной формы индивидуального обучения.

Активизации изучения иммунологии и повышению индивидуальной мотивации способствует тесный контакт процесса преподавания с работой Проблемной лаборатории по изучению механизмов естественного иммунитета ОрГМУ, где проводятся экскурсии для студентов, демонстрируются современные методики иммунологических исследований. Результаты клинических исследований, проводимых на базе данной лаборатории, используются в учебном процессе в качестве наглядных пособий при решении конкретных ситуационных задач.

Взаимообусловленность форм и методов обучения, развития и воспитания, а также реализация мотивированной активности студентов дают позитивные результаты, объективным показателем которых является высокий рейтинг по итогам рубежного контроля и собеседования по иммунологии, у 75,5% студентов он выше 50 баллов при максимальном показателе 70 баллов.

Представленный материал преподавания иммунологии на кафедре микробиологии, вирусологии, иммунологии Оренбургского государственного медицинского университета является обобщенным опытом работы коллектива, в процессе которой осуществляется образование, развитие и воспитание будущего врача, необходимое для успешной деятельности, мотивированной индивидуальными потребностями и теми знаниями, умениями и навыками, которые были приобретены в процессе обучения.

Методы и формы, используемые в процессе преподавания способствуют с одной стороны оптимизации учебного процесса, а с другой определяют ценностную ориентацию изучения иммунологии для дальнейшей профессиональной деятельности будущего специалиста.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Руководство к практическим занятиям медицинской микробиологии, вирусологии, иммунологии. Под ред. Бухарина О.В. Медицина, Москва 2002, 340.
2. Руководство по организации и проведению практических занятий по медицинской микробиологии. Под ред. Бухарина О.В. УрО РАН, Екатеринбург 2009, 399.

## METHODICAL ASPECTS OF IMMUNOLOGY TEACHING AT THE DEPARTMENT OF MICROBIOLOGY, VIROLOGY, IMMUNOLOGY

Lyashenko I. E., Mikhailova E. A., Zheltova V. I.,  
Kirgizova S. B., Zherebyateva O. O.

*Orenburg State Medical University, Orenburg, Russia*

Methodical aspects of the immunology teaching at the department of microbiology, virology, immunology are presented. Significance of composite approach to learning process for development of motivational activity of students in the discipline studying is designated. Efficiency of used academic methods in studying of immunology by students for further professional activity is shown.

*Keywords:* immunology, teaching and professional competence.

---

---

## ОПЫТ ПРЕПОДАВАНИЯ ИММУНОЛОГИИ, БИОТЕХНОЛОГИИ. ПРОБЛЕМЫ, СВЯЗАННЫЕ С ТРЕБОВАНИЯМИ ФГОС-3

Москалёв А. В., Зачиняева А. В.

*Военно-медицинская академия им. С. М. Кирова, Санкт-Петербург, Россия*

Статья посвящена вопросам преподавания иммунологии и биотехнологии на кафедре микробиологии Военно-медицинской академии имени С. М. Кирова. Авторы вносят конкретные практические предложения для их внедрения в образовательный процесс в целях его совершенствования.

*Ключевые слова:* иммунология, биотехнология, кафедра.

**Введение.** В соответствии с Федеральным государственным образовательным стандартом третьего поколения (ФГОС-3) иммунология выделена в самостоятельную учебную дисциплину на факультетах подготовки врачей. В настоящее время по-прежнему остро стоит вопрос о месте преподавания иммунологии: на кафедре микробиологии, вирусологии и иммунологии или на кафедрах патологической физиологии, клинической биохимии, биологии и т.д. Достижения в области биотехнологии заложили основы новой медицины, которые тесно переплетаются с такими проблемами как аллергия, вакцинопрофилактика, иммуномодулирующая терапия и др., поэтому, в настоящее время, вопросы преподавания биотехнологии чрезвычайно актуальны и заняли свое место в структуре, как основной образовательной программы,

так и особенно в целях и задачах программы «иммунология».

**Цель исследования.** Оценить эффективность многолетнего преподавания иммунологии, биотехнологии на кафедре микробиологии Военно-медицинской академии имени С. М. Кирова, выявить проблемы и пути их решения.

**Результаты и их обсуждение.** На кафедре микробиологии ВМедА имени С. М. Кирова более 13 лет ведется преподавание избранных вопросов иммунологии для клинических ординаторов по специальностям: психиатрия, патологическая анатомия, токсикология, трансфузиология, эпидемиология, травматология. Программы для ординаторов по этим специальностям кроме сходства по общим вопросам принципиально отличаются по времени, ответственному для изучения разделов, тем и видов



учебных занятий, а самое главное по целям и задачам изучения дисциплины.

С 2013 г иммунология впервые выделена как самостоятельная учебная дисциплина на факультетах подготовки врачей по специальности «Лечебное дело», «Стоматология» на которую отводится 72 часа. На современном этапе развития иммунологии как науки она стремительно продолжает углубляться. Остро стоит вопрос выделения приоритетных тем, в зависимости от профиля учреждения, специальности обучаемых, которые должны быть представлены в комплексе с характеристиками классических факторов, относящихся к врожденному и приобретенному иммунитету. Перед преподавателями стоят непростые вопросы, которые должны быть в основном решены в отведенные программой 72 часа. Понятно, что это гораздо сложнее, чем преподавание избранных вопросов иммунологии уже сложившимся специалистам. Так как вопросы, относящиеся к характеристике антигенов, антител, биологии Т- и В-лимфоцитов и их субпопуляций, регуляторных Т-лимфоцитов, рецепторных структур иммунокомпетентных клеток, механизмов апоптоза, анергии, механизмов формирования центральной и периферической толерантности, выбора оптимального пути иммунного ответа и др. являются, по-настоящему сложнейшей проблемой для студентов, которые впервые знакомятся с иммунологией [2].

Основным видом патологии, с которым сталкиваются выпускники Военно-медицинской академии – это инфекционная патология, которая, по отчетности медицинской службы ВС РФ, составляет до 80% всей патологии личного состава по призыву. Знать особенности работы иммунной системы при различных инфекционных процессах, в условиях практически сформировавшихся вторичных иммунодефицитных состояний у призывников и значительно изменившейся антигенной структуры многих, еще недавно казавшихся банальными возбудителями инфекционных заболеваний, является наиболее актуальным для сегодняшних выпускников академии. Изучение особенностей антибактериального, противовирусного, противопаразитарного и антимикотического иммунного ответов, механизмов формирования гиперчувствительности к условно-патогенной микробиоте у военнослужащих по призыву, вопросов

вакцинопрофилактики является наиболее актуальным.

Исходя из вышеизложенного, следует, что довольно остро стоит проблема подготовки национальных учебно-методических материалов (пособий, учебно-методических разработок и др.). Они должны достоверно, лаконично излагать современный материал, отражающий вопросы общей иммунологии, иммунобиотехнологии, взаимосвязи иммунной системы с различными вариантами соматической патологии, аллергии, вопросами вакцинопрофилактики и биотехнологии.

Современные методы иммунодиагностики являются важным источником диагностической информации, которые основаны на достижениях биотехнологии и позволяют поднять уровень диагностики на совершенно другой уровень, как по чувствительности, так и по специфичности.

В настоящее время ведутся биотехнологические разработки новых методов диагностики, лечения на основе генной и клеточной терапии. В мировой медицине осуществляется переход от лечения конкретных болезней и дисфункций к системной работе со здоровьем в целом. Предпочтение отдается превентивной медицине и персональной работе с конкретным человеком на уровне генома. Многие виды рака, а также генетические и нейродегенеративные заболевания, такие, как болезнь Альцгеймера и Паркинсона, являются потенциальными кандидатами на генную и клеточную терапию. Преподавание биотехнологии в высших медицинских учебных заведениях принадлежит к числу актуальных проблем общей подготовки врачей. К сожалению, традиционная форма преподавания биотехнологии будущим врачам характеризуется разрывом между теоретическими знаниями и возможностью использовать эти знания в практической деятельности врача. Это требует пересмотра организации учебного процесса. Назрела и необходимость создания дополнительных учебно-методических материалов по биотехнологии. Целесообразно выделить «медицинскую биотехнологию», как в отдельный курс, так и гармоничное включение ее вопросов в программу общей иммунологии. Подготовка врачей по биотехнологии должна быть комплексной, с введением в обучение вопросов «молекулярной биологии», «энзимологии», «генной инженерии», «генной терапии» как

необходимых составляющих иммунологии и медицинской биотехнологии. Ряд вопросов биотехнологии, может быть включен и в другие дисциплины, в частности – в микробиологию. На сегодняшний день биотехнология как наука оторвана от производства. Дефицит кадров в медицинской промышленности составляет 30-40 тыс. человек, а все вузы страны выпускают в год не более 1000 специалистов по биотехнологии [3]. Поэтому необходима более тесная связь медицинских университетов с биотехнологическими компаниями и научно-исследовательскими институтами, что позволит студентам приобрести навыки практической работы, а университетам подобрать для преподавания наиболее подготовленные кадры. Это позволит также привлечь дополнительные средства в развитие университетской науки.

**Заключение.** Таким образом, основываясь на многолетнем опыте преподавания вопросов иммунологии, биотехнологии, нам представляется, что в первую очередь необходимо решить следующие вопросы. На первых курсах (5-й семестр и не ранее) для всех факультетов преподавать вопросы общей иммунологии с проблемами и достижениями в биотехноло-

гии. В соответствии с прежним учебным планом целесообразно оставить на этот цикл 3 зачетные единицы. На старших курсах (9–10 семестр) в программу обучения включить вопросы, отражающие основы клинической иммунологии, также не менее 3-х зачетных единиц. На наш взгляд, это позволит ликвидировать существующий разрыв в преподавании иммунологии и биотехнологии теоретических знаний и практической деятельностью врача. В цикл общей иммунологии включить вопросы «молекулярной биологии», «энзимологии», «генной инженерии», «генной терапии». Конечно, поставленные задачи не решаются без улучшения технической оснащенности кафедр и наличием профессорско-преподавательского состава высокой квалификации.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Новосад Е. // Экология и жизнь. 2010. № 6. С. 22-23.
2. Abbas A. K., Lichtman A. H., Pillai S. Cellular and molecular immunology. 6th ed. Philadelphia, 2009. 566 p.
3. Akhondzadeh S. // Avicenna journal of medical biotechnology, January-March 2015, Volume 7, P. 1-4.

### EXPERIENCE IN TEACHING IMMUNOLOGY AND BIOTECHNOLOGY. PROBLEMS ASSOCIATED WITH THE REQUIREMENTS OF THE FEDERAL STATE EDUCATIONAL STANDARD – 3

Moskalev A. V., Zachinyaeva A. V.

*Medical Military Academy, Saint-Petersburg, Russia*

**Abstract.** The article is devoted to the teaching of immunology and biotechnology at the Department of Microbiology of the Military Medical Academy named after S. M. Kirov (St. Petersburg). The authors make definite and practical suggestions for their implementation in the educational process in order to optimize it.

**Key words:** Immunology, biotechnology, chair.

**II ВСЕРОССИЙСКАЯ  
ШКОЛА-КОНФЕРЕНЦИЯ МОЛОДЫХ  
УЧЕНЫХ «СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ  
МИКРОБИОЛОГИИ, ИММУНОЛОГИИ  
И БИОТЕХНОЛОГИИ»**



**Раздел 1**  
**ЭКОЛОГИЯ И ГЕНЕТИКА**  
**МИКРООРГАНИЗМОВ**

## ВЫЯВЛЕНИЕ СИТОСТЕРИН-ИНДУЦИРУЕМЫХ ГЕНОВ, КОДИРУЮЩИХ ФЕРМЕНТЫ ДЕГРАДАЦИИ КОЛЕЦ С И D СТЕРОИДНОГО ЯДРА У МИКОБАКТЕРИЙ, ТРАНСФОРМИРУЮЩИХ СТЕРИНЫ

Брагин Е. Ю.<sup>1</sup>, Штратникова В. Ю.<sup>2</sup>, Довбня Д. В.<sup>1</sup>,  
Щелкунов М. И.<sup>3</sup>, Донова М. В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрабина РАН, Пущино;

<sup>2</sup>Факультет биоинженерии и биоинформатики, МГУ им. Ломоносова, Москва;

<sup>3</sup>Институт проблем передачи информации, РАН, Москва, Россия

Данная работа посвящена выявлению ситостерин-индуцируемых генов, вовлеченных в деградацию колец С и D стероидного ядра у штаммов *Mycobacterium neoaurum* ВКМ Ас-1815D, 1816D и *Mycobacterium sp.* ВКМ Ас-1817D. У штаммов 1815 и 1816 для генов катаболизма колец С и D не выявлено отчетливого увеличения экспрессии на среде, содержащей ситостерин, тогда как большинство генов катаболизма колец С и D у штамма 1817 значительно увеличили свою экспрессию.

**Ключевые слова:** микобактерии, стеринны, катаболизм стериннов, стерин-индуцируемые гены.

**Актуальность и цель работы.** Многие бактерии способны использовать стеринны в качестве источника энергии и углерода. Гены и ферменты, участвующие в катаболизме стериннов, в настоящее время активно изучаются. Это связано с тем, что многие промежуточные продукты окисления стериннов могут быть использованы в качестве сырья для производства соединений, используемых в фармацевтической промышленности, а также в связи с открытием роли стероидного катаболизма в патогенезе многих микобактерий, в частности, *Mycobacterium tuberculosis*. Однако многие детали стероидного катаболизма по-прежнему остаются неизвестными. В частности, недостаточно изучены механизмы деструкции колец С и D стероидного ядра ферментными системами микобактерий.

У *M. smegmatis* гены катаболизма колец С и D, в отличие от остальных генов катаболизма стериннов, регулируются транскрипционным фактором KstR2, который является репрессором, относящимся к семейству TetR [1]. Ранее нами было проведено сравнительное исследование геномов стеринтрансформирующих

микобактерий – *M. neoaurum* ВКМ Ас-1815D, 1816D и *Mycobacterium sp.* ВКМ Ас-1817D, и выявлены гены, участвующие в раскрытии кольца В стероидного ядра у исследованных микобактерий [2]. Кроме того, осуществлена сборка полных геномов штаммов *M. neoaurum* ВКМ Ас-1815D и *Mycobacterium sp.* ВКМ Ас-1817D [3,4].

**Целью** данной работы было изучение генов, вовлеченных в окислительную деградацию колец С и D стероидного ядра у трех штаммов – продуцентов 3-кетоандростанов, – *Mycobacterium neoaurum* ВКМ Ас-1815D, 1816D и *Mycobacterium sp.* ВКМ Ас-1817D.

**Материалы и методы.** Штаммы микобактерий были получены из Всероссийской коллекции микроорганизмов (ВКМ ИБФМ РАН). Бактерии культивировали на среде следующего состава (г/л): глицерин – 5, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – 3; MgSO<sub>4</sub> – 0.2; FeSO<sub>4</sub>–0.0; ZnSO<sub>4</sub>–0.002, калий фосфатный буфер (рН 7,2) – 50 мМ, в присутствии ситостерина (5 г/л) или без добавления стериннов. Культуру растили в течение 24-30 часов при температуре 30 °С. Выделение и обогащение мРНК осуществлялось с помо-

щью наборов RNeasy Mini Kit фирмы Qiagen (Германия) и MICROB Express фирмы Ambion (США). Секвенирование транскриптомов осуществляли на высокопроизводительном секвенаторе HiSeq 2000 фирмы Illumina (США).

**Результаты.** Для выявления генов, предположительно участвующих в катаболизме колец С и D стероидного ядра у исследуемых штаммов микобактерий, мы провели поиск генов, гомологичных генам, регулируемым транскрипционным фактором KstR2 у *M. smegmatis* [1]. При исследовании транскриптома *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 выявлено 15 генов, регулируемых KstR2. Эти гены входят в состав первого кластера холестерин-индуцируемых генов [5] и представлены в геноме тремя группами (*MSMEG\_5999* – *MSMEG\_6004*, *MSMEG\_6008* – *MSMEG\_6009* *MSMEG\_6011* – *MSMEG\_6017*) [1].

У штаммов 1815, 1816 и 1817 выявлены гомологи всех вышеупомянутых генов. При этом они входят в состав групп, практически идентичных таковым у *M. smegmatis* [1]. Единственное отличие заключается в том, что у штаммов 1815 и 1816 в оперон, гомологичный оперону *MSMEG\_6013* – *MSMEG\_6017*, входит еще один ген, не имеющий гомологов среди регулона KstR2 у *M. smegmatis*. Однако, в целом, организация генов катаболизма колец С и D у рассмотренных микобактерий представляется довольно консервативной.

Для прояснения механизмов деградации стероидов мы сравнили экспрессию генов, входящих в регулон KstR2, у культур, выращенных на среде, содержащей ситостерин, и не содержащей стероидов. У штаммов 1815 ни один

из 15 генов катаболизма колец С и D не увеличил свою экспрессию более чем в три раза. Это контрастирует с тем, что большинство генов стероидного катаболизма, входящих в один кластер с генами деструкции колец С и D, но не регулируемых KstR2, увеличили свою экспрессию на среде, содержащей ситостерин, в среднем в 10 раз. Иная картина наблюдается у штамма *Mycobacterium sp.* VKM Ac-1817D. Все 15 генов катаболизма колец С и D у данного штамма значительно увеличили свою экспрессию. В среднем их экспрессия увеличилась в 15 раз. Такое различие в экспрессии генов катаболизма колец С и D у штамма 1817 и штаммов 1815 и 1816 может быть, отчасти, обусловлено большей активностью катаболизма ядра стероидов у штамма 1817.

Работа поддержана грантом РФФИ (соглашение № 14–24–00169).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Garcia-Fernandez J., Galan B., Medrano F.J., Garcia J.L. *Env Microbiol Rep* 2015, 7 (1), 155-163
2. Bragin E. Y., Shtratnikova V. Y., Dovbnaya D. V., Schelkunov M. I., Pekov Y. A., Malakho S. G., Egorova O. V., Ivashina T. V., Sokolov S. L., Ashapkin V. V., Donova M. V. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2013, 138, 41-53.
3. Shtratnikova V. Y., Bragin E. Y., Dovbnaya D. V., Pekov Y. A., Schelkunov M. I., Strizhov N., Ivashina T. V., Ashapkin V. V., Donova M. V. *Genome Announc* 2014, 2 (1), 16.
4. Shtratnikova V. Y., Schelkunov M. I., Dovbnaya D. V., Pekov Y. A., Bragin E. Y., Ashapkin V. V., Donova M. V. *Genome Announc* 2015, 29, 3 (1).
5. Uhía I., Galán B., Kendall S. L., Stoker N. G., García J. L. *Environ Microbiol Rep* 2012, 4 (2), 168-82.

### IDENTIFICATION OF SITOSTEROL-INDUCED GENES ENCODING STEROID NUCLEUS RINGS C AND D DEGRADATION IN STEROL TRANSFORMING STRAINS OF MYCOBACTERIA

Bragin E. Y.<sup>1</sup>, Shtratnikova V. Y.<sup>2</sup>, Dovbnaya D. V.<sup>1</sup>,  
Shchelkunov M. I.<sup>3</sup>, Donova M. V.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>GK Stryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, RAS, Pushchino; <sup>2</sup>Moscow Lomonosov State University, Department of Bioengineering and Bioinformatics, Moscow; <sup>3</sup>Institute for Information Transmission Problems, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

This work was intended to identify the sitosterol-induced genes involved in the degradation of C and D rings of the steroid nucleus in strains *Mycobacterium neoaurum* VKM Ac-1815D, 1816D and *Mycobacterium sp.* VKM Ac-1817D. In strains 1815 and 1816, genes of C and D rings' catabolism did not clearly increase their expression in sitosterol containing medium, while most genes of C and D rings' catabolism in strain 1817 significantly increased their expression.

## БАКТЕРИИ-ДЕСТРУКТОРЫ БИФЕНИЛА ИЗ МИКРОБНОГО СООБЩЕСТВА ДОННЫХ ОТЛОЖЕНИЙ, ЗАГРЯЗНЕННЫХ ТОКСИЧНЫМИ ХЛОРАРОМАТИЧЕСКИМИ СОЕДИНЕНИЯМИ

Воронина А. О., Плотникова Е. Г.

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

В результате проведения ряда экспериментальных работ: накопительное культивирование, детекция ключевых генов деструкции бифенила/ПХБ (*bphA1*-генов) методом ПЦР и выделение в чистую культуру бактерий-деструкторов бифенила, – было установлено, что в бактериальном сообществе донных отложений реки Чапаевки (г. Чапаевск, Самарская область), загрязненных токсичными хлорароматическими соединениями, присутствуют бактерии рода *Rhodococcus* – деструкторы бифенила/полихлорбифенилов.

*Ключевые слова:* бифенил, полихлорированные бифенилы, бактерии-деструкторы, *bphA1*-гены.

**Актуальность и цель работы.** Одной из наиболее острых экологических проблем является антропогенное загрязнение окружающей среды стойкими органическими загрязнителями (СОЗ). К широко распространенным поллютантам группы СОЗ относятся полихлорированные бифенилы (ПХБ) – высокотоксичные ароматические соединения, исключительно устойчивые к физическим и химическим воздействиям (<http://www.unep.org>).

Одним из перспективных способов их утилизации является биодеструкция с использованием микроорганизмов [1]. Разложение бифенила и ПХБ до стадии бензойной или соответствующей хлорбензойной кислоты происходит у разных микроорганизмов по одному биохимическому пути. На первом этапе разложения бифенил окисляется до бифенил-дигидродиола бифенил 2,3-диоксигеназой (*BphA1*), которая является ключевым ферментом, осуществляющим первую реакцию гидроксирования (включение двух гидроксильных групп в ароматическое кольцо) бифенила.  $\alpha$ -Субъединица *BphA1* отвечает за распознавание субстрата и связывание с ним, в связи с чем ген *bphA1* является важным маркером при исследовании биодеградационного потенциала бактериального сообщества [2].

**Цель работы** – изучение бактерий-деструкторов бифенила/ПХБ из микробного сообщества донных отложений реки Чапаевки (г. Чапаевск, Самарская область), загрязнённых токсичными хлорароматическими соединениями.

В задачи исследования входило: путём накопительного культивирования на бифениле получить ассоциацию микроорганизмов из образцов загрязненных донных отложений реки Чапаевки; выделить активные бактерии-деструкторы бифенила из полученных накопительных культур; определить наличие *bphA1*-генов в накопительных культурах и отдельных штаммах бактерий-деструкторов.

**Материалы и методы.** Объектом исследования являлись накопительные культуры микроорганизмов-деструкторов бифенила, полученные из образцов донных отложений реки Чапаевки, протекающей вдоль территории ОАО «Средне-Волжского завода химикатов» (г. Чапаевск, Самарская область). Для получения накопительных культур и последующего выделения штаммов микроорганизмов использовалась жидкая минеральная среда K1 [3] с добавлением бифенила (1 г/л) в качестве единственного источника углерода и энергии. Чистые культуры бактерий-деструкторов выделяли на агаризованной среде K1 с бифе-



нилом в качестве субстрата. Для выделения тотальной ДНК из накопительных культур использовали набор реактивов для выделения геномной ДНК из почвы («MP Biomedicals», USA), концентрацию ДНК определяли на приборе Qubit™ Fluorometer, («Invitrogen», USA), с использованием реактивов («Invitrogen», USA). ДНК из чистых культур бактерий выделяли методом «щелочного лизиса». Амплификацию гена 16S рРНК осуществляли с использованием стандартных бактериальных праймеров [4]. Амплификацию *bphA1* генов, кодирующих  $\alpha$ -субъединицы ферментов подсемейства бифенил/толуол диоксигеназ, проводили с использованием вырожденных праймеров [5]. ПЦР осуществляли на амплификаторе MyCycler («Bio-Rad Laboratories», USA). Определение нуклеотидных последовательностей проводили на автоматическом секвенаторе Genetic Analyser 3500XL («Applied Biosystems», USA) в соответствии с рекомендациями производителя. Анализ нуклеотидных последовательностей осуществляли с использованием программ CLUSTAL W (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>) и Sequence Scanner v1.0. Поиск гомологичных последовательностей проводили в базе данных ezTaxon (<http://www.ezbiocloud.net/eztaxon>).

**Результаты.** Методом накопительного культивирования на бифениле получены четыре ассоциации микроорганизмов (обозначенные как VR1, VR2, VR3, VR4). Из полученных накопительных культур выделена тотальная ДНК, концентрация которой составляла: для VR1 ( $7,27 \pm 0,1$  мкг/мл); VR2 ( $41,5 \pm 0,1$  мкг/мл); VR3 ( $4,98 \pm 0,1$  мкг/мл); VR4 ( $6,24 \pm 0,1$  мкг/мл).

Исследования качества выделенной тотальной ДНК из накопительных культур проводили с помощью широко используемого филогенетического маркера – гена 16S рРНК. Анализ ПЦР-фрагментов ДНК показал наличие ампликонов предполагаемого размера (около 1500 п.н.) во всех исследуемых образцах. Методом ПЦР проведено исследование тотальной ДНК из накопительных культур на наличие нуклеотидных последовательностей (генов *bphA1*), кодирующих  $\alpha$ -субъединицы ферментов подсемейства бифенил/толуол диоксигеназ. С по-

мощью вырожденных праймеров [5] со всех четырех ДНК-матриц (образцов исследуемой ДНК) были получены ПЦР-продукты ожидаемой длины (500 п.н.). Таким образом, можно предположить, что в накопительных культурах присутствуют бактерии-деструкторы бифенила.

Из накопительных культур VR3 и VR4 были выделены 4 бактериальных штамма-деструктора (обозначенные как VR31–1; VR33; VR41–21; VR43–1). Бактерии при выращивании в течение 3 сут на агаризованной среде LB образуют округлые, матовые, светло-бежевые колонии размером 1–3 мм. Клетки грамположительные, неподвижные, не образуют спор. На основе анализа гена 16S рРНК культуры были отнесены к роду *Rhodococcus* (100% сходство с типовым штаммом вида *R. wratislaviensis*). Штаммы VR31–1, VR33, VR41–21 и VR43–1 способны использовать бифенил как ростовой субстрат: оптическая плотность (ОД600) культур при выращивании в жидкой среде K1 с бифенилом (1 г/л) достигала 0,9 о.е. В геноме выделенных штаммов методом ПЦР выявлены *bphA1*-гены.

Таким образом, в результате проведенных исследований было установлено, что в бактериальном сообществе донных отложений реки Чапаевки (г. Чапаевск, Самарская область), загрязненных токсичными хлорароматическими соединениями, присутствуют бактерии рода *Rhodococcus* – деструкторы бифенила /полихлорбифенилов.

Работа выполнена при поддержке Программой УрО РАН «Молекулярная и клеточная биология», проект № 15-4-4-13.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Cao B., Nagarajan K., Loh K. Appl Microbiol Biotechnol 2009, 85, 207-228.
2. Pieper D. H. Appl Microbiol Biotechnol 2005, 67, 170-191.
3. Егорова Д. О., Шумкова Е. С., Демаков В. А., Плотникова Е. Г. ПБиМ 2010, 46 (6), 644-650.
4. Turola M. A., Mannisto M. K., Puhakka J. A., Kulomaa M. S. Appl Microbiol Biotechnol 2002, 68, 173-180.
5. Baldwin B. R., Nakatsu C. H., Nies L. Appl Microbiol Biotechnol 2003, 69 (6), 3350-3358.

## BIPHENYL-DEGRADING BACTERIA FROM MICROBIAL COMMUNITY OF BOTTOM SEDIMENTS POLLUTED WITH TOXIC CHLORORGANIC COMPOUNDS

Voronina A. O., Plotnikova E. G.

*Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms UB RAS, Perm, Russia*

As a result of implementation a number of experiments including enrichment culture, detection of key genes for biphenyl/PCB degradation (*bphA1*-genes) using PCR and isolation in pure culture the biphenyl bacteria-degraders it was determined that the bacterial community from bottom sediments of the Chapaevka river (Chapaevsk, Samara Region) polluted with toxic chlororganic compounds was represented by the bacteria of genus *Rhodococcus* that degraded biphenyl/polychlorbiphenyls.

## ГЕНОТИПИРОВАНИЕ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*, ИЗОЛИРОВАННЫХ В УСЛОВИЯХ ПРОМЫШЛЕННОГО ПТИЦЕВОДСТВА

Гордина Е. М.<sup>1</sup>, Горовиц Э. С.<sup>1</sup>, Поспелова С. В.<sup>1</sup>,  
Тимашева О. А.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ГБОУ ВПО Пермский государственный медицинский университет имени академика Е. А. Вагнера Минздрава России; <sup>2</sup>Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь, Россия

Обсуждаются вопросы обмена штаммами *Staphylococcus aureus* между сотрудниками птицефабрики и птицами. С помощью молекулярно-генетического анализа показано, что большинство изученных изолятов характеризуется индивидуальным генопрофилем. «Птичьи» изоляты отличались большим разнообразием геновариантов. Установлено, что 1 из штаммов *S. aureus*, изолированный от человека, по своему RAPD-профилю был близок группе «птичьих» штаммов. В то же время культуры, выделенные от птиц, по своему генетическому материалу отличались от изолятов сотрудников.

*Ключевые слова:* генотипирование, *Staphylococcus aureus*.

**Актуальность и цель работы.** Бактерии рода *Staphylococcus* отличаются широким кругом естественных «хозяев» и входят в состав микробиоты человека и животных, в том числе птиц. Специфика объектов промышленного птицеводства – тесный производственный контакт человека и птиц предполагает возможный обмен штаммами микроорганизмов. Поскольку штаммы, изолированные от птиц, как правило, характеризуются антибиотикорезистентностью и наличием определенного набора факторов вирулентности, то они могут представлять потенциальную угрозу для здоровья сотрудников птицефабрики, контактирующих с птицами.

Известно, что молекулярно-генетические методы позволяют выявлять генетические маркеры и вариации нуклеотидных последовательностей ДНК, поэтому с их помощью можно определить родство и различия изучаемых штаммов микроорганизмов, в частности *Staphylococcus aureus*, циркулирующих на объектах промышленного птицеводства.

**Цель работы** – оценка генетической гетерогенности штаммов *S. aureus*, изолированных от сотрудников птицефабрики и птиц.

**Материалы и методы.** Выполнено бактериологическое обследование 53 сотрудников крупной птицефабрики Пермского края, непосредственно контактирующих с птицами,

и 612 проб внутренних органов 151 птицы: печень, сердце, селезенка, легкие и др. Материал получали от бройлеров различных возрастов (от 2 до 45 сут), в процессе санитарного забоя. Выделение и идентификацию культур стафилококков осуществляли общепринятым методом [1]. Культуры стафилококков идентифицировали на основании изучения биохимических свойств, используя тест-системы «Staphytest 24» (ERBA LACHEMA, Чехия). Оценку результатов осуществляли с помощью компьютерной программы «Микроб-2».

Тотальную ДНК 27 изолятов *S. aureus* выделяли модифицированным методом, предложенным J. Marmur. В реакции амплификации использовали произвольные праймеры с различным процентом GC пар: праймер А (GTTTCGCTCC), праймер 6 (GAGACGCACA), праймер 7 (CAGCCAGAG) (синтезированы в ООО «НПФ Синтол», г. Москва, Россия), рекомендованные для генотипирования стафилококков [2].

Амплификацию проводили на термоциклере DNA Engine Dyad Thermal Cycler (BioRad, США). Протоколы ПЦР соответствовали рекомендациям авторов, предложивших используемые праймеры. Температурный режим реакции включал денатурацию при 94 °С в течение 30 с, отжиг праймеров при 36 °С в течение 30 с. Элонгацию проводили при 72 °С в течение 120 с. Электрофоретическое разделение продуктов реакции осуществляли в 1,2% агарозном геле при напряженности электрического поля 6 В/см. Визуализацию полос и документирование данных выполняли с помощью системы геледокументации Gel-DocXR (BioRad, США). В качестве маркера использовали маркер молекулярных весов ДНК Ladder 100 bp (ЦНИИ Эпидемиологии, Москва). Результаты оценивали по наличию или отсутствию фрагментов ДНК определенного размера на диаграммах, построенных с применением компьютерного обеспечения QuantityOne (версия 4.6.1, Bio-Rad Laboratories, США) [2].

При анализе полученных электрофореграмм продуктов амплификации ДНК, штаммы *S. aureus* относили к одному геномоварианту при идентичности результатов не менее чем по двум праймерам.

**Результаты.** Всего от работников птицефабрики и птиц выделено 470 штаммов стафилококков различных видов. Из них 27 культур

*S. aureus*, 10 – от сотрудников и 17 – от кур. По результатам ПЦР все штаммы *S. aureus* отнесены к 15 геномовариантам.

На основании анализа результатов амплификации ДНК изучаемых культур, штаммы *S. aureus*, выделенные от сотрудников, были разделены на 3 геномоварианта (I–III). К первому и второму отнесены по 2 изолята, к третьему – 3. Три оставшихся изолята обладали индивидуальными геномопрофилями. 13 штаммов *S. aureus*, выделенных от птиц, по характеру своего генетического материала сгруппированы в 5 геномовариантов (соответственно IV–VIII). Четыре – обладали индивидуальными RAPD-профилями. Таким образом, в общей сложности 7 изолятов *S. aureus* (3 – от сотрудников), в соответствии с результатами генотипирования, выделены в самостоятельные геномоварианты (IX–XV).

Важно подчеркнуть, что по своему генопрофилю штамм *S. aureus*, изолированный от сотрудников (отнесенный к самостоятельному геномоварианту), был близок к группе штаммов птиц VIII геномоварианта. Следовательно, от человека был выделен штамм *S. aureus*, по своим генетическим характеристикам идентичный штаммам птиц. В условиях птицефабрики в результате тесного контакта птиц и обслуживающего персонала происходит обмен микроорганизмами.

В то же время, практически все культуры *S. aureus*, выделенные от человека и птиц, отличались по своему генопрофилю, что свидетельствует об их внутривидовых различиях. Это подтверждается и генетической близостью большинства изолятов, выделенных от определенного хозяина.

Следует отметить и тот факт, что ряд штаммов, изолированных от птиц в различные периоды времени (интервал 2–3 года), имели идентичные нуклеотидные последовательности. Очевидно, в течение длительного времени на птицефабрике циркулируют одни и те же штаммы стафилококков, несмотря на систематическое применение дезинфицирующих и антибактериальных средств.

По результатам RAPD-ПЦР все штаммы *S. aureus*, изолированные от сотрудников и птиц, отнесены к 15 геномовариантам. Среди изолятов птиц определено 9 геномовариантов, человека – 6. Преобладали индивидуальные геномопрофили. Таким образом, с помощью молекулярно-генетического анализа между

штаммами *S. aureus*, изолированными от сотрудников и птиц, были выявлены внутривидовые различия. Вместе с тем, один штамм, выделенный от сотрудников, по своему генотипу был идентичен 4-м «птичьим» изолятам, что свидетельствует об обмене штаммами стафилококков между сотрудниками и птицами.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Об унификации микробиологических методов исследования, применяемых в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений. Приказ МЗ СССР № 535 от 22.04.1985 г.
2. Антонов В. А., Крамарь В. О. International Journal of Applied and Fundamental Research 2011, 12, 64-68.

## GENOTYPING OF *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ISOLATED FROM THE POULTRY PLANT

Gordina E. M.<sup>1</sup>, Gorovitz E. S.<sup>1</sup>, Pospelova S. V.<sup>1</sup>, Timasheva O. A.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Academician E. A. Wagner Perm State Medical University; <sup>2</sup>Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, UB RAS, Perm, Russia

Issues of the wide exchange of *Staphylococcus aureus* strains among the staff of poultry farm and chicken were discussed. As a result of molecular genetic analysis we showed that most of the studied isolates were characterized by individual genetic variant. "Bird" isolates were distinguished by great diversity in genetic variants. It was established that one of the strains of *S. aureus* isolated from a person in their RAPD-profile was close to the group of "bird" strains. At the same time, cultures isolated from birds differed in their genetic material from the isolates of the employees.

## ДЕТЕКЦИЯ ГЕНОВ ДЕГРАДАЦИИ ПОЛИЦИКЛИЧЕСКИХ АРОМАТИЧЕСКИХ УГЛЕВОДОРОДОВ В БАКТЕРИАЛЬНЫХ СООБЩЕСТВАХ РАЙОНА СОЛЕРАЗРАБОТОК МЕТОДОМ ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ

Корсакова Е. С.<sup>1</sup>, Назаров А. В.<sup>1,2</sup>, Плотникова Е. Г.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>ФГБУН Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН;  
<sup>2</sup>ФГБОУ ВПО Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

Изучено распространение генов деградации полициклических ароматических углеводородов и проведена их количественная оценка в бактериальных сообществах района промышленных солеразработок (Пермский край) с использованием метода ПЦР в реальном времени. Наибольшее количество копий *PAH-RHD<sub>α</sub>*-генов выявлено в почвенных образцах с территории соледобывающего предприятия г. Соликамска, характеризующихся высокой концентрацией органических загрязнителей.

**Ключевые слова:** ПЦР в реальном времени, бактерии-деструкторы ПАУ, гидроксимирующие диоксигеназы ПАУ, гены *PAH-RHD<sub>α</sub>*.

**Актуальность и цель работы.** Район промышленных разработок Верхнекамского месторождения калийно-магниевых и натриевых солей (Пермский край) характеризуется высоким уровнем загрязнения различными моно-

и полиароматическими углеводородами, фталатами и галогенсодержащими органическими соединениями [1]. В почвах района солеразработок выявлено большое разнообразие экстремофильных микроорганизмов, способных

к разложению подобных экотоксикантов [2]. В большинстве исследований были использованы методы, основанные на выделении бактерий в чистые культуры и не позволяющие оценить все многообразие штаммов-деструкторов, существующих в условиях техногенного засоления/загрязнения. В настоящее время для изучения функционирования сообществ микроорганизмов-деструкторов в различных экотопах все более широко используется принцип количественного определения ключевых генов деградации определенных загрязняющих веществ методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ).

Цель настоящей работы – детекция и количественный учет генов деградации полициклических ароматических углеводородов (PAH-RHD $\alpha$ -генов) в образцах почвы, донных отложений техногенных водоемов и шламохранилищ, отобранных на территории промышленных солееразработок предприятий ПАО «Уралкалий».

**Материалы и методы.** Образцы почвы были отобраны на расстояние 2–5 м от солеотвалов СКПРУ-1 (калийное управление № 1 г. Соликамск) и БКПРУ-3 (калийное управление № 3 г. Березники). На территории предприятия БКПРУ-3 были отобраны образцы донных отложений из рассолосборника вблизи солеотвала и образцы поверхностного слоя шламохранилища. Также в исследованиях были использованы донные отложения сточного канала предприятия ООО «Промканал» (г. Березники). ДНК из исследуемых образцов была экстрагирована с помощью набора Fast DNA Spin Kit («MP Biomedicals», США) согласно инструкции производителя и составляла 10–20 мкг/мл.

Органические загрязнители определяли в хлороформных экстрактах проб (образцов) с использованием хромато-масс-спектрометра Agilent 6890/5973N («Agilent», США). Идентификацию веществ осуществляли по масс-спектрам с применением библиотеки NIST 98. В составе исследованных проб присутствовали различные алифатические углеводороды (в концентрации от 288 до 57312 мг/кг) и ароматические соединения (41–4244 мг/кг).

В качестве объекта исследования были выбраны бактериальные гены, кодирующие  $\alpha$ -субъединицу гидроксигенирующих диоксигеназ (PAH-RHD $\alpha$ ), участвующих в окислении различных полициклических ароматических углеводородов (ПАУ) [3].

ПЦР-РВ проводили с использованием бактериальных праймеров PAH-RHD $\alpha$ GNF и PAH-RHD $\alpha$ GNR в присутствии красителя Sybr Green I с использованием набора реактивов производства «Синтол» (Россия). Набор праймеров был разработан для амплификации генов, кодирующих  $\alpha$ -субъединицу гидроксигенирующих диоксигеназ грамотрицательных бактерий [4]. Специфичность праймеров PAH-RHD $\alpha$ GNF и PAH-RHD $\alpha$ GNR была проверена на ДНК контрольных штаммов бактерий, обладающих данным типом диоксигеназ (положительный контроль, штамм *Pseudomonas* sp. SN11) и не имеющих их (отрицательный контроль, штамм *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ F'), а также анализом линии плавления ДНК. Для стандартной калибровочной кривой был использован образец очищенной геномной ДНК штамма *Pseudomonas* sp. SN11. Эффективность ПЦР определяли методом серийных разведений с построением калибровочной кривой.

**Результаты.** Методом классической ПЦР с использованием праймеров PAH-RHD $\alpha$ GNF и PAH-RHD $\alpha$ GNR были проведены предварительные эксперименты по скринингу тотальной ДНК, изолированной из образцов почвы, донных отложений техногенных водоемов, шламохранилищ района солееразработок, на наличие PAH-RHD $\alpha$ -генов. В качестве контрольного образца была взята дерново-подзолистая почва без загрязнения ПАУ. Искомый ген был обнаружен только в семи образцах ДНК, которые и были взяты для дальнейших исследований.

Согласно полученным данным, после проведенного количественного анализа (ПЦР-РВ), наибольшее число копий гена PAH-RHD $\alpha$  ( $8 \times 10^8$ ) было выявлено в почвенном образце (рисосферная почва ежи сборной (*Dactylis glomerata* L.), отобранном на расстоянии 2 м от солеотвала (г. Соликамск). Данный образец характеризовался высокой концентрацией органических загрязнителей, анализ масс-спектров которых указывает на загрязнение исследованного участка нефтепродуктами. На том же участке, но в почве без растений, количество копий искомого гена на порядок ниже и составляет  $4,9 \times 10^7$ . Возможно, это обусловлено так называемым ризосферным эффектом, при котором концентрация бактерий, обнаруженных в прикорневой зоне, значительно превышает их концентрацию в почве [5].

Распределение копий *PAH-RHD<sub>α</sub>*-гена в пяти образцах, отобранных с техногеннозагрязненных участков в г. Березники, было примерно одинаковым. В районе солеотвала БКПРУ-3, а именно в донных отложениях рассолосборника и в ризосферной почве бескильницы расставленной (*Puccinellia distans* Parl.), произрастающей в непосредственной близости от него, количество копий *PAH-RHD<sub>α</sub>*-генов составляло  $3,5-5,7 \times 10^7$ . В двух образцах донных отложений промканала, а также поверхностного слоя шламохранилища БКПРУ-3 количество копий искомого гена варьировало от  $3,8 \times 10^7$  до  $5,7 \times 10^7$ . Загрязнителями на данных участках в основном были алифатические углеводороды и ароматические соединения, в том числе нафталин (37–2002 мг/кг).

Таким образом, с использованием метода ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) установлено распространение генов деградации полициклических ароматических углеводородов

и проведена их количественная оценка в бактериальных сообществах района промышленных солееработок (Пермский край).

Работа выполнена при поддержке Программой УрО РАН «Молекулярная и клеточная биология», проект № 15-4-4-13 и гранта РФФИ-Урал № 13-04-96048 p\_урал\_a.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бачурин, Б.А., Одинцова Т.А. Горный информационно-аналитический бюллетень 2009, 7, 374-380.
2. Плотникова Е. Г., Алтынцева О. В., Кошелева И. А. и др. Микробиология 2001, 70, 61-69.
3. Jureleviciusa D., Alvareza V. M., Peixotob R. et al. Appl Soil Ecology 2012, 55, 1–9.
4. Cébron A., Norini M.- P., Beguiristain T., Leyval C. J Microbiol Methods 2008, 73, 148-159.
5. Manoharachary C., Mukerji K. G. Microbial Activity in the Rhizosphere. In: Soil Biology. Mukerji. K.G., Manoharachary C. and Singh J. (Eds.), Springer-Verlag, Heidelberg, Berlin 2006, 15.

### DETECTION OF GENES FOR POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBON DEGRADATION IN BACTERIAL COMMUNITIES OF THE SALT MINING AREA USING REAL-TIME PCR

Korsakova E. S.<sup>1</sup>, Nazarov A. V.<sup>1,2</sup>, Plotnikova E. G.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, UB RAS; <sup>2</sup>Perm State National Research University, Perm, Russia

Distribution of genes for degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons and their quantification in bacterial communities in the salt mining area (Perm Krai) was studied using real-time PCR (RT-PCR). The largest number of copies of *PAH-RHD<sub>α</sub>*-genes was detected in soil samples from the territory of Solikamsk salt producing enterprise that were characterized by high concentration of organic pollutants.

## РАЗНООБРАЗИЕ БАКТЕРИЙ-ДЕСТРУКТОРОВ ОРГАНИЧЕСКИХ ЗАГРЯЗНИТЕЛЕЙ ШЛАМОХРАНИЛИЩА КАЛИЙНОГО ПРОИЗВОДСТВА (Г. БЕРЕЗНИКИ, ПЕРМСКИЙ КРАЙ)

Корсакова Е. С.<sup>1</sup>, Шестакова Е. А.<sup>1</sup>, Хайрулина Е. А.<sup>2</sup>,  
Назаров А. В.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>ФГБУН Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН;

<sup>2</sup>ФГБОУ ВПО Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

С использованием индекса Шеннона оценено разнообразие бактерий-деструкторов фталевой кислоты, нафталина и бифенила шлама и почвы в условиях техногенного засоления. Установлено, что разнообразие изученных сообществ бактерий-деструкторов сильно зависит от концентрации соответствующих веществ загрязнителей, при этом не выявлено значительного негативного влияния имеющегося техногенного засоления на разнообразие бактерий.

*Ключевые слова:* техногенное засоление, калийное производство, шлам, почва, разнообразие бактерий.

**Актуальность и цель работы.** В настоящее время засоление территорий является одним из наиболее распространенных процессов, негативно влияющих на окружающую среду. Однако при этом до сих пор слабо изучены микробные сообщества почв и грунтов при их техногенном засолении с сопутствующим загрязнением токсичными органическими соединениями. Между тем эти данные необходимы для прогноза способности данных сред к самоочищению и разработки стратегии их биоремедиации.

**Цель** настоящей работы – оценка разнообразия бактерий-деструкторов фталевой кислоты, нафталина и бифенила шлама и почвенного покрова на берегу шламохранилища в условиях техногенного засоления.

**Материалы и методы.** Объектом исследования являлось шламохранилище Березниковского рудоуправления, расположенного в окрестностях г. Березники Пермского края. В шламохранилище поступают глинисто-солевые отходы, образующиеся в процессе обесшламливания сильвинитовой руды. Они состоят из 35-40% водорастворимых солей (в основном NaCl и KCl) и 60-65% нерастворимого осадка. Используемые при флотации

различные реагенты обогащают отходы сложными токсичными органическими соединениями, которые с фильтрационными водами могут мигрировать в окружающей среде.

В качестве материалов исследования были отобраны образцы шлама и почвенного субстрата, представленного техногенными почвами, в непосредственной близости от шламохранилища. Почвенный субстрат (образец 1) был отобран с берега шламохранилища в 3 м от рассола, пробы шлама (образец 2) – в 1 м от рассола, и образец 3 – возле уреза рассола. Отбирался верхний слой шлама и почвенного субстрата на глубине 0–10 см.

Для оценки общего содержания водорастворимых солей в почвенном субстрате и шламах определяли плотный остаток водной вытяжки из почвы и шламов общепринятыми методами [1]. Определение содержания катионов  $\text{Na}^+$  осуществляли на атомно-абсорбционном спектрофотометре AA-6300 («Shimadzu», Япония). Органические загрязнители определяли в хлороформенных экстрактах проб с использованием хромато-масс-спектрометра Agilent 6890/5973N («Agilent», США), хроматограммы анализировали в программе MSD Productivity ChemStation («Agilent», США), идентифика-

цию веществ осуществляли по масс-спектрам с применением библиотеки NIST 98. Количественное определение органических веществ проводили методом градуировки по площадям пиков.

Микробиологический анализ образцов проводили общепринятыми методами посева [2]. Биоразнообразие сообществ бактерий-деструкторов оценивали с помощью индекса Шеннона, используя дифференцированный подсчет колоний, принадлежащих к разным морфотипам [3]. В работе использовали среду Раймонда (г/л):  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  – 2,  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,2,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 2,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  – 3,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  – 0,1,  $\text{CaCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$  – 0,01 [4].  $\text{NaCl}$  добавляли в среды до конечной концентрации 5%. Для получения агаризованных сред вносили агар («Sigma», США) 15 г/л. В качестве ростовых субстратов использовали нафталин, бифенил или орто-фталевую кислоту в количестве 1 г/л.

**Результаты.** Химический анализ отобранных с территории шламохранилища проб почвенного субстрата и шламов показал высокую степень их засоленности, а также значительное содержание органических загрязнителей (алканов, полициклических углеводородов, моноароматических углеводородов, эфиров фталевой кислоты). При этом в большинстве случаев концентрация солей и органических загрязнителей возрастала с уменьшением расстояния от рассола, на котором была отбрана проба. Исключение составляет образец шлама 1, содержащий в 1915 меньшее количество эфиров фталевой кислоты, чем почва. Химический состав отобранных проб приведен ниже.

Образец 1. Содержание плотного остатка водной вытяжки – 1,8%,  $\text{Na}^+$  – 11079,3 мг/кг, алканов – 31020,5 мг/кг, полициклических углеводородов – 946,2 мг/кг, эфиров фталевой кислоты – 191,5 мг/кг. Моноароматические углеводороды не обнаружены.

Образец 2. Содержание плотного остатка водной вытяжки – 3,2%,  $\text{Na}^+$  – 16634,5 мг/кг, алканов – 61614,7 мг/кг, моноароматических углеводородов – 14,0 мг/кг, полициклических углеводородов – 1663,8 мг/кг, эфиров фталевой кислоты – 0,1 мг/кг.

Образец 3. Содержание плотного остатка водной вытяжки – 12,1%,  $\text{Na}^+$  – 24099,3 мг/кг, алканов – 117066,9 мг/кг, моноароматических углеводородов – 514,2 мг/кг, полициклических

углеводородов – 4017,4 мг/кг, эфиров фталевой кислоты – 5653,2 мг/кг.

Выявлена зависимость разнообразия бактерий-деструкторов в образцах от концентрации в них органических загрязнителей. С повышением концентрации эфиров фталевой кислоты в образцах, как правило, увеличивался индекс Шеннона бактериального сообщества деструкторов орто-фталевой кислоты, а с возрастанием содержания моно- и полиароматических углеводородов увеличивался индекс Шеннона бактерий-деструкторов нафталина и бифенила. При этом не выявлено значительного негативного влияния техногенного засоления на разнообразие бактерий, так как наиболее загрязненные органическими соединениями образцы являлись также и наиболее засоленными и имели, как уже было сказано, большее разнообразие бактерий-деструкторов.

Так индекс Шеннона для почвенных сообществ бактерий-деструкторов орто-фталевой кислоты составлял 2,69, деструкторов нафталина – 1,69, деструкторов бифенила – 0,97. Значение индекса Шеннона для сообществ шлама 1 и шлама 2 для бактерий-деструкторов орто-фталевой кислоты – 1,96 и 2,16, соответственно, деструкторов нафталина – 2,38 и 3,28, деструкторов бифенила – 2,30 и 1,53.

Таким образом, разнообразие изученных сообществ бактерий-деструкторов сильно зависит от концентрации соответствующих веществ загрязнителей, при этом не выявлено значительного негативного влияния имеющегося техногенного засоления на разнообразие бактерий.

Работа поддержана грантами РФФИ-Урал № 13-04-96048 «Изучение механизмов функционирования микробно-растительных систем в условиях засоления почвы» и РФФИ № 15-05-07461 «Ландшафтно-геохимическая структура в условиях техногенного галогенеза».

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Минеев В. Г. (ред.) Практикум по агрохимии МГУ, Москва 2001.
2. Звягинцев Д. Г. (ред.) Методы почвенной микробиологии и биохимии. МГУ, Москва 1991.
3. Широких И. Г., Товстик Е. В., Дабах Е. В., Ашихмина Т. Я. Почвоведение 2013, 7, 860-866.
4. Розанова Е. П., Назина Т. Н. Микробиология 1982, 51, 324-348.



## DIVERSITY OF BACTERIA-DESTRUCTORS OF ORGANIC POLLUTANTS FROM SLUDGE STORAGE OF POTASH PRODUCTION (BEREZNIKI, PERM KRAI)

Korsakova E. S.<sup>1</sup>, Shestakova E. A.<sup>1</sup>, Khairulina E. A.<sup>2</sup>, Nazarov A. V.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, UB RAS; <sup>2</sup>Perm State National Research University, Perm, Russia

With the use of the Shannon index the diversity of bacteria-destructors of phthalic acid, naphthalene and biphenyl from sludge and soil was evaluated under the conditions of technogenic salinization. It was found that a variety of analyzed communities of bacteria-destructors was highly dependent on the concentration of the relevant polluting substances, while significant negative effect of technogenic salinization on a variety of bacteria was not observed.

---

---

## ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ШТАММА ВКМ В-762, СОДЕРЖАЩЕГО УНИКАЛЬНУЮ ТЕЙХОЕВУЮ КИСЛОТУ В КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКЕ

Кудряшова Е. Б., Арискина Е. В., Присяжная Н. В.

ИБФМ им. Г. К. Скрябина РАН, Пуццоно, Россия

Проведено определение последовательности гена *gyrB* штамма ВКМ В-762, отличающегося от всех видов группы “*Bacillus subtilis*” содержанием в клеточной стенке уникальной тейхоевой кислоты – поли(ацилглицозилполиолфосфат). Филогенетический анализ показал наибольшее сходство с подвидом *B. subtilis* subsp. *inaquosorum*. Сравнительное изучение методом МАЛДИ-ВП МС штамма ВКМ В-762 и типовых штаммов ближайших подвидов *B. subtilis* subsp. *inaquosorum*, *B. subtilis* subsp. *subtilis*, и *B. subtilis* subsp. *spizizenii* выявило в масс-спектрах наличие индивидуальных пиков, отличающих штаммы. Полученные результаты позволяют предположить, что штамм ВКМ В-762 является представителем нового таксона.

Ключевые слова: *Bacillus subtilis*, ген *gyrB*, МАЛДИ-ВП МС.

Группа “*Bacillus subtilis*” включает близкородственные виды, которые имеют 99,5–100,0% сходства последовательностей генов 16S рРНК и образуют плотную филогенетическую группу. Виды данной группы представляют большой интерес с биотехнологической, сельскохозяйственной и медицинской точек зрения, в связи с чем проведение точной идентификации является актуальной задачей. С целью поиска дополнительного таксономического критерия, позволяющего провести разграничения между близкородственными видами, ранее нами изучались состав и структура анионных полимеров клеточных стенок штаммов, включая и типовые, группы “*Bacillus subtilis*”, в ходе которого у штамма ВКМ В-762 была выявлена

уникальная тейхоевая кислота. В клеточной стенке штамма ВКМ В-762 наряду с тейхоевой кислотой 1,5-поли(рибитфосфат), все повторяющиеся звенья которой несут в положении 4 рибита остатки 2-ацетамидо-2-дезоксид-β-D-глюкопиранозы (β-D-GlcpNAc), обнаруженной у типовых штаммов подвидов *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* и *B. subtilis* subsp. *inaquosorum*, содержится полимер – поли(ацилглицозилполиолфосфат) с необычным типом связей и глицериновой кислотой в качестве компонента повторяющегося звена, впервые описанный у грамположительных бактерий [1]. Определение нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК показало принадлежность штамма В-762 к группе “*Bacillus subtilis*”. Уро-

вень сходства с подвидами *B. subtilis* subsp. *inaquosorum*, *B. subtilis* subsp. *spizizenii* и *B. subtilis* subsp. *subtilis* составил 100,0%, 99,7% и 99,7%, соответственно. В связи с высокой консервативностью этого гена, близкородственные виды могут иметь почти идентичные или идентичные последовательности [2], что не позволяет использовать результаты анализа 16S рРНК генов для определения видовой принадлежности штаммов бактерий. В данном случае анализ генов из группы “генов домашнего хозяйства” (“house-keeping genes”), детерминирующих основные процессы метаболизма, показывает более высокую разрешающую способность при рассмотрении родства между организмами на видовом, внутривидовом и штаммовом уровнях [3]. Корреляция сходства нуклеотидных последовательностей гена *gyrB* с данными ДНК-ДНК гибридизации была продемонстрирована для видов группы “*Bacillus subtilis*” [4]. Поэтому дальнейшее изучение таксономического положения штамма ВКМ В-762 было проведено с помощью анализа функционального гена *gyrB*, кодирующего  $\beta$ -субъединицу АТФ-гидролизующей ДНК топоизомеразы. Для штамма ВКМ В-762 получен фрагмент гена *gyrB* длиной 801 п.н. Филогенетический анализ показал высокий процент сходства (98,88%) с типовым штаммом подвида *B. subtilis* subsp. *inaquosorum* Rooney et al. 2009, с типовыми штаммами подвида *B. subtilis* subsp. *spizizenii* Nakamura et al. 1999 и *B. subtilis* subsp. *subtilis* (Ehrenberg 1835) Nakamura et al. 1999 уровень сходства составил 96,0% и 94,51%, соответственно.

Идентифицировать микроорганизмы на уровне вида и подвида позволяет также метод матрично-активированной лазерной десорбционно-ионизационной времяпролетной масс-спектрометрии (МАЛДИ-ВП МС) бактериальных клеток [5]. Регистрируемые пики в диапазоне масс 2000–20000 m/z соответствуют в основном пептидам и белкам, среди которых присутствуют пики специфичные для видов, подвида, геномогрупп. Методом МАЛДИ-ВП МС был проведен сравни-

тельный анализ масс-спектров штамма ВКМ В-762 и типовых штаммов видов *B. subtilis* subsp. *subtilis* ВКМ В-501, *B. subtilis* subsp. *inaquosorum* ВКМ В-2572 и *B. subtilis* subsp. *spizizenii* ВКМ В-2654. В масс-спектрах исследуемого штамма ВКМ В-762 выявлены индивидуальны пики (2197 м\*, 2340, 2794, 3282 м, 4018 м, 4232 м m/z), количество которых было наименьшим среди сравниваемых видов. Наибольшее отличие среди сравниваемых штаммов обнаружено в масс-спектрах типового штамма вида *B. subtilis* subsp. *spizizenii* ВКМ В-2654 (2575, 3218, 3224, 3417, 3425, 3448, 3496, 3540, 3676, 3689, 3845, 3865, 4120, 4182 м, 4207, 4558, 4570, 4579 м, 5013, 5042, 5173, 5631, 6140, 6837, 6890, 6909, 7271, 7730, 7757, 8985 м, 9114 м, 10081, 11256, 11579, 12274, 12918 м, 13666 m/z). (\*Примечание: м – пики малой интенсивности). Количество отличительных пиков в масс-спектрах типовых штаммов *B. subtilis* subsp. *subtilis* и *B. subtilis* subsp. *inaquosorum* существенно меньше (14 и 10, соответственно).

Таким образом, результаты филогенетического анализа фрагмента гена *gyrB* показали высокое сходство штамма ВКМ В-762 с типовым штаммом подвида *B. subtilis* subsp. *inaquosorum*. Однако МАЛДИ-ВП МС выявлены отличия масс-спектрометров ВКМ В-762 как с типовым штаммом данного подвида, так и с типовым штаммом подвида *B. subtilis* subsp. *subtilis*. Полученные результаты позволяют предположить, что штамм является представителем нового таксона.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Shashkov A. S., Streshinskaya G. M., Kozlova Yu. I., Senchenkova S. N., Arbatsky N. P., Kudryashova E. B. Carbohydr Res 2011, 346, 1173-1177.
2. Ludwig W. Int J Food Microbiol 2007, 120, 225-236.
3. Santos S. R., Ochman H. Environ Microbiol 2004, 6, 754-759.
4. Wang L. T., Lee F. L., Tai C. J., Kasai H. Int J Syst Evol Microbiol 2007, 57, 1846-1850.
5. Dridi B., Drancourt M. Methods Microbiol 2011, 38, 283-297.

## PHYLOGENETIC ANALYSIS OF THE STRAIN VKM B-762 CONTAINING UNIQUE TEICHOIC ACID IN THE CELL WALL

Kudryashova E. B., Ariskina E. V., Prisyazhnaya N. V.

*Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms,  
Pushchino, Russia*

The *gyrB* gene sequence of the strain VKM B-762, distinguished by the presence of unique teichoic acid in the cell wall – poly (acylglycosyl polyol phosphate) from all species of the “*Bacillus subtilis*” group was determined. Phylogenetic analysis showed the most similarity to subspecies *B. subtilis* subsp. *inaquosorum*. Using MALDI-TOF MS a comparative study of the strain VKM B-762 and the type strains of the close subspecies *B. subtilis* subsp. *inaquosorum*, *B. subtilis* subsp. *subtilis* and *B. subtilis* subsp. *spizizenii* revealed in the mass spectra the presence of the individual peaks that make the strains different. The results obtained allow for assuming that the strain VKM B-762 is a representative of a new taxon.

---

---

## ИЗУЧЕНИЕ СТРУКТУРЫ МИКРОБНОГО СООБЩЕСТВА ПОЧВ С РАЗНОЙ АНТРОПОГЕННОЙ НАГРУЗКОЙ

Максимова А. В., Позюмко Э. Н., Кузнецова М. В.

*ФГБУН Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН,  
Пермь, Россия*

Показано, что за исключением  $\beta$ -*Proteobacteria*, представителей всех фил было больше в почвах естественной среды, по сравнению с почвами с антропогенной нагрузкой, однако разница была статистически незначима. При изучении *in vitro* влияния акрилонитрила на структуру почвенного сообщества наиболее значимые изменения отмечены на уровне семейств, тогда как все филы, за исключением *Armatimonadetes* и Candidate Division WPS-1 и WPS-2, сохранились.

**Ключевые слова:** почвенные бактерии, таксономический состав, ПЦР в реальном времени, метагеномный анализ.

**Актуальность и цель работы.** Таксономический состав микробного сообщества почвы является важным показателем ее экологического состояния и функционирования. Применение в почвенной экологии методов молекулярного анализа позволило обойти некоторые ограничения традиционных методик, связанных с культивированием бактерий [1].

**Цель исследования:** изучить структуру микробного сообщества почв разной антропогенной нагрузки с помощью молекулярно-генетических методов.

**Материалы и методы.** В анализ были взяты образцы почв естественной среды (n=8) и антропогенно-загрязненные (n=6). Общее количество различных групп бактерий в исследуемых почвах определяли путем прямого высева на селективные агаризованные среды.

Метагеномную ДНК выделяли согласно научно-методическим рекомендациям [2]. Полимеразную цепную реакцию в реальном времени (ПЦР РВ) проводили в присутствии красителя SYBR Green I (Синтол, Москва) согласно протоколу производителя. Для анализа структуры почвенных сообществ использовали праймеры к гену универсальной 16S рРНК для *Eubacteria* и основных филогенетических групп бактерий: *Acidobacteria*, *Actinobacteria*,  $\alpha$ - и  $\beta$ -*Proteobacteria* [3]. Для детекции гена *nha*, кодирующего  $\alpha$ -субъединицу железосодержащей нитрилгидратазы, применяли праймеры FE-F (ttggtaccgacgggttacgt) / FE-R (cgcgccttggactgaagt) для родококков и nhpA-F (tcaagagcaaggaactcatc) / nhpA-R (ttccgtccttgagcagcagc) для псевдомонад как представителей грамположительной и грамотрицательной микробиоты в почве.

Обработку результатов проводили с использованием программного обеспечения Bio-Rad CFX Manager 2.1. Количество продукта амплификации рассчитывали по формуле  $N=2^{40-Ct}$  с учетом разведения, где N – число копий гена, вступивших в реакцию, Ct – значение порогового цикла. Результат ПЦР РВ выражали в виде числа копий гена на грамм почвы. Метагеномное секвенирование фрагмента гена 16S рРНК проводили на пиросеквенаторе Roche GS Junior (США) совместно с Институтом общей генетики им. Н.И. Вавилова, г. Москва. Статистическую обработку данных проводили с использованием компьютерных программ Microsoft Office XP Excel и «Statistica 5».

**Результаты.** Установлено, что количество гетеротрофных сапрофитных микроорганизмов варьировало от  $2,67 \times 10^6$  клеток/г сухой дерново-луговой почвы с пониженным увлажнением до  $2,17 \times 10^{10}$  клеток/г сухой степной почвы и статистически значимо не различалось в двух массивах ( $p=0,428$ ). Отмечено более высокое содержание грамположительных бактерий в антропогенно-загрязненных почвах ( $p=0,037$ ). Количество нитрилутилизующих бактерий колебалось от  $1,00 \times 10^5$  клеток/г сухой дерново-луговой почвы с пониженным увлажнением до  $7,50 \times 10^7$  клеток/г сухой техногенно-засоленной почвы. Методом ПЦР РВ выявлено, что среди рассмотренных филогенетических групп бактерий доминирующими оказались *Acidobacteria* и  $\alpha$ -*Proteobacteria*. Показано, что за исключением  $\beta$ -*Proteobacteria*, представителей всех фил было больше в почвах естественной среды, по сравнению с почвами с антропогенной нагрузкой. Средние значения содержания этих бактерий в двух группах отличались на порядок, однако разница была статистически незначима ( $p>0,05$  по M-U тесту). Оказалось, что общее содержание бактерий по ПЦР РВ было выше, чем при высеве почвенной суспензии на плотные питательные среды ( $p=0,005$ ), а содержание нитрилутилизующих прокариот – ниже ( $p=0,014$ ). При сопоставлении данных числа бактерий по двум методам наблюдалась умеренная корреляционная зависимость ( $r=0,65$ ;  $p=0,05$ ). В то же время, связь отсутствовала между показателями, характеризующими число нитрилутилизующих микроорганизмов ( $r=0,21$ ). Данный факт вполне ожидаем вследствие того, что продуценты нитрилгидратаз распространены среди различных видов бактерий.

Интересным представлялось проанализировать *in vitro* изменение микробного состава подзолистой почвы естественной среды при ее искусственном загрязнении акрилонитрилом (АкН). В результате метагеномного анализа исходной пробы обнаружено 6009 последовательностей гена 16S рРНК, принадлежащих домену *Bacteria*. Спустя 3 месяца, после 4-х кратного внесения АкН в концентрации 200 мг/кг почвы (100 ПДК) детектировали 6615 последовательностей, а в концентрации 2000 мг/кг почвы (1000 ПДК) – 3213. Анализ таксономической структуры микробиома исходной почвы на уровне домена выявил присутствие 14 бактериальных фил: *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Acidobacteria*, *Nitrospirae*, *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Armatimonadetes*, *Parcubacteria*, *Chloroflexi*, *Gemmatimonadetes*, *Planctomycetes*, *Candidatus Saccharibacteria*, candidate division WPS-1 и WPS-2. Положение доминирующих групп бактерий занимали представители фил *Proteobacteria* (36,88%), *Bacteroidetes* (23,78%), *Acidobacteria* (13,03%) и *Actinobacteria* (3,20%). Таксономическую принадлежность значительной части последовательностей установить не удалось, что обусловлено неполнотой имеющихся баз данных и характерно для метагеномных исследований. После многократного внесения в почву АкН в концентрации 100 и 1000 ПДК все представленные филы сохранились, за исключением *Armatimonadetes*, candidate division WPS-1 и WPS-2. Наиболее значимые изменения бактериальной микрофлоры загрязненных образцов по отношению к контролю отмечены в группе протеобактерий, при этом различий на уровне классов не выявлено. Так, в исходной почве обнаружено 15 семейств  $\alpha$ -*Proteobacteria*, а после трех месяцев эксперимента их количество сократилось до 8. Чувствительными к АкН оказались такие семейства как *Rhizobiaceae*, *Beijerinckiaceae*, *Rhodobiaceae*, *Rickettsiaceae* и ряд других. В классе  $\beta$ -*Proteobacteria* изменения носили только численный характер: в опытных вариантах увеличилось представительство бактерий семейства *Burkholderiaceae*. Среди  $\gamma$ -*Proteobacteria* необходимо отметить устойчивость к нитрильному загрязнению бактерий семейства *Pseudomonadaceae*, относительное содержание которых даже несколько увеличилось, и чувствительность *Enterobacteriaceae*, которые практически не детектирова-

лись в варианте 1000 ПДК. Среди грамотрицательных бактерий также следует указать прирост числа *Bacteroidia* при концентрации нитрила 100 ПДК и снижение разнообразия *Acidobacteria* с 13 классов до 8–9 в вариантах 100 и 1000 ПДК. Внесение 200 мг/кг токсиканта способствовало увеличению разнообразия *Clostridia* из фила *Firmicutes* до 10 семейств, тогда как в варианте 1000 ПДК детектировали только 2. Возможно, последняя концентрация нитрила является токсичной даже для спор бактерий. В опытных образцах также повысилось относительное содержание актинобактерий (от 3,2% в контроле до 12,4% в варианте 1000 ПДК), причем наиболее значимые количественные изменения произошли в семействе *Nocardiaceae*, что еще раз подтверждает их исключительную способность приспосабливаться к действию различного рода внешних факторов.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о высоком адаптивном потенциале почвенной микробиоты. Применение двух дополняющих друг друга молекулярных методов позволяет решать разные задачи: оценивать в почвах количественное содержание различных филогенетических групп бактерий и проводить глубокий качественный анализ состава почвенного сообщества.

Работа выполнена в рамках гранта РФФИ 13-04-96050.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Jonsson V. Thesis for the degree of licentiate of philosophy. Chalmers University of Technology and University of Gothenburg, 2014, 22 p.
2. Андронов Е. Е., Пинаев А. Г., Першина Е. В., Чижевская Е. П. Санкт-Петербург, 2011, 23 с.
3. Fierer N., Jackson J. A., Vilgalys R., Jackson R. B. *Appl Environ Microbiol* 2005, 71, 4117-4120.

### STUDY OF MICROBIAL COMMUNITY STRUCTURE FROM SOILS WITH DIFFERENT ANTHROPOGENIC LOADS

Maksimova A. V., Pozyumko E. N., Kuznetsova M. V.

*Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, UB RAS, Perm, Russia*

It is shown that with the exception of  $\beta$ -*Proteobacteria*, representatives of all phyla were more abundant in soils of natural environment, as compared with soils with anthropogenic loads, but the difference was not statistically significant. Most changes within *in vitro* experimental study of the acrylonitrile effect on the soil community structure were detected at the family level, whereas all of the phyla except *Armatimonadetes* and Candidate Division WPS-1 and WPS-2 remained unchanged.

## МЕТАГЕНОМНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МИКРОЦЕНОЗОВ СУГЛИНИСТЫХ ПОЧВ ПЕРМСКОГО КРАЯ И ВСТРЕЧАЕМОСТЬ В НИХ ЭУБАКТЕРИЙ, ОБЛАДАЮЩИХ ВЫСОКОЙ АМИДАЗНОЙ АКТИВНОСТЬЮ

Позюмко Э. Н.<sup>1,2</sup>, Луговская Н. П.<sup>2</sup>, Павлова Ю. А.<sup>1,2</sup>,  
Максимов А. Ю.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>ФГБУН Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН;

<sup>2</sup>ФГБОУ ВПО Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

В результате метагеномных исследований обнаружено, что наибольшую долю микробиоты дерново-луговой почвы составляют представители филы *Proteobacteria* – 53,73%, также значительное количество было представлено филами *Bacteroidetes* (17,51%) и *Actinobacteria* (6,24%). Показано, что бактерии, трансформирующие амиды и нитрилы, обнаружены во всех исследованных почвах в количестве  $10^5$ - $10^8$  КОЕ/г по сухому весу. Наибольшее количество изолятов, способных к росту на простых солевых средах, составляли представители родов *Rhodococcus* и *Pseudomonas*.

**Ключевые слова:** почвенные бактерии, штамм, таксономический состав, полимеразная цепная реакция, метагеномный анализ.

**Актуальность и цель работы.** Успешное применение микроорганизмов и ферментных препаратов из них в биокаталитических технологиях зависит от свойств ферментов: скорости гидролиза субстрата, pH и температурного оптимума активности ферментов, субстратной избирательности, оптимального состава рабочей среды. Различные ферменты существенно различаются по этим свойствам, что помогает оценить перспективы использования продуцентов. Поэтому селекция и изучение бактерий – активных продуцентов амидаз является актуальным направлением микробиологических исследований [1].

**Цель** данной работы – изучение биоразнообразия микроорганизмов дерново-луговой тяжелосуглинистой почвы Пермского края и исследование изолятов, активно метаболизирующих амиды и нитрилы карбоновых кислот.

**Материалы и методы.** Материалом для выделения метагеномной ДНК и микроорганизмов служили образцы естественных дерново-луговых тяжелосуглинистых почв Пермского края. Анализ разнообразия и таксономического состава эубактерий проводили с использованием метода пиросеквенирова-

ния. Метагеномную ДНК из образцов выделяли с помощью набора Diatom DNA Prep 200, с применением ферментативного лизиса. ПЦР проводили набором Tersus PCR kit (Eurogen, Россия). Метагеномное секвенирование фрагмента гена 16S рРНК проводили на пиросеквенаторе Roche GS Junior (США) совместно с коллегами из Института общей генетики им. Н. И. Вавилова, г. Москва. Полученные последовательности были идентифицированы путем сравнения с последовательностями базы данных Ribosomal Database Project (RDP).

Активные изоляты выделяли методами накопительной культуры и прямого высева на минеральной среде N с добавлением амидов и нитрилов в качестве единственных источников углерода и азота. Идентификацию бактерий проводили методами полифазной таксономии с использованием диагностических ключей Определителя бактерий Берджи и руководств [2, 3]. Активность ферментов метаболизма амидов и нитрилов определяли с помощью газовой хроматографии на приборе GC-10, Shimadzu и ВЭЖХ (LC-10, Shimadzu).

Препараты хромосомной ДНК бактерий получали фенольным методом. ПЦР-анализ генов амидаз и нитрилгидратаз проводили

с праймерами, специфичными к известным последовательностям гомологов, приведенным в базе данных GenBank.

Статистическую обработку данных проводили с использованием компьютерных программ Microsoft Office XP Excel и «Statistica 5».

**Результаты.** Проведен скрининг микрофлоры образцов естественной дерново-луговой тяжелосуглинистой почвы с повышенным увлажнением на суглинистой основе, отобранной в Нытвенском и Краснокамском районах Пермского края. Обнаружено, что наибольшую долю микробиоты дерново-луговой почвы составляют представители фила *Proteobacteria* – 53,73%, также значительное количество было представлено филами *Bacteroidetes* (17,51%) и *Actinobacteria* (6,24%). Выявленное соотношение фил имеет сходство с метагеномным профилем образцов дерново-подзолистой почвы Тверской области, однако в последнем значительно большим количеством были представлены актинобактерии [4]. Из общего количества протеобактерий 49,49% составляли представители класса альфа-протеобактерий, 21,34% – гамма-, 11,9% – бета- и 3,07% – эпсилон-протеобактерии.

Данные метагеномного анализа расходятся с соотношением количеств культивируемых бактерий в почвенной среде: в частности, в период низкого уровня увлажнения, актинобактерии составляли до 19% изолятов, а по данным метагеномики доля их ДНК в 3 раза меньше. Такие расхождения связаны с тем, что метагеномный анализ отражает всё разнообразие ДНК, представленных в почве, включая генетический материал нежизнеспособных, некультивируемых и лизированных клеток.

Исследовано биологическое разнообразие бактерий дерново-луговой тяжелосуглинистой лесной почвы, способных активно метаболизировать амиды и нитрилы карбоновых кислот. Показано, что исследуемые почвы содержат значительное количество бактерий, трансформирующих производные карбоновых кислот. Наибольшее их содержание отмечено в верхних горизонтах почв и в ризосферной зоне растений. Вероятно, это связано с метаболической активностью растений, в экссудате корней которых содержатся амидные и нитрильные соединения. Меньшая численность деструкторов наблюдалась в нижележащих слоях. Бактерии, трансформирующие амиды

и нитрилы, обнаружены во всех исследованных почвах в количестве  $10^5$ - $10^8$  КОЕ/г сухой почвы.

Установлено, что изолированные культуры образуют симбиотические сообщества, трудно разделяемые, способные во взаимодействии активно метаболизировать нитрилы. При прямом высеве из почвенного экстракта на селективную среду такие сообщества, состоящие из 2–5 культур разных видов, росли в виде гомогенных, либо различающихся в периферической части колоний. Существование таких сообществ характерно для почвенных изолятов [5]. Такие ассоциации, составлявшие до 9% колоний, как правило, сохранялись при пересеве на минимальную среду, но легко разделялись на среде LB.

Большая часть высеваемых микроорганизмов относится к бактериям родов *Arthrobacter*, *Acidovorax*, *Azomonas*, *Bacillus*, *Rhodococcus*, *Pseudomonas* и др. В сравнении с другими типами почв, в образцах дерново-луговой почвы было обнаружено наибольшее количество активных изолятов. Установлено, что среди бактерий, растущих на простых солевых средах и проявляющих высокую гидролитическую активность по отношению к амидам и нитрилам, 29% принадлежали к роду *Rhodococcus* (из них 15% – представители *R. erythropolis*; 7% – *R. ruber*; 5% – *R. rhodochrous*, 2% – *R. luteus*), 12% относились к другим родам актинобактерий и 4% к видам других грамположительных бактерий. Также в значительном количестве были представлены бактерии рода *Pseudomonas sp.* – 20% (в т.ч., 9% – *P. fluorescens*, 6% – *P. putida*), а 19% – другие протеобактерии.

Работа выполнена в рамках Государственного задания на выполнение научно-исследовательской работы № 6.2635.2014/К.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Перцович С. И., Гуранда Д. Т., Подчерняев Д. А. и др. Биохимия 2005, 11, 1556-1565.
2. Ившина И. Б., Пшеничных Р. А., Оборин А. А. Пропанокисляющие родококки. УНЦ АН СССР, Свердловск 1987, 126 с.
3. Нестеренко О. А., Квасников Е. И., Ногина Т. М. Нокардиоподобные и коринеподобные бактерии. Наукова думка, Киев 1985, 336 с.
4. Чирак Е. Л., Першина Е. В., Дольник А. С. С.-х. биол. 2013, 3, 100-109.
5. Коростик Е. В., Пинаев А. Г., Ахтемова Г. А., Андронов Е. Е. Экол. генет. 2006, 4, 32-37.

## METAGENOMIC CHARACTERIZATION OF LOAMY SOIL MICROBIOCENOSIS IN PERM TERRITORY CONTAINING THE EUBACTERIA WITH HIGH AMIDASE ACTIVITY

Pozyumko E. N.<sup>1,2</sup>, Lugovskaya N. P.<sup>2</sup>, Pavlova Y. A.<sup>1,2</sup>, Maksimov A. Yu.<sup>1,2</sup>

*Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, UB RAS Perm, Russia*

It was found that the largest proportion of the microbiota sod-meadow soils comprised the representatives of the phylum *Proteobacteria* – 53.73%, a considerable amount was represented by phyla *Bacteroidetes* (17.51%) and *Actinobacteria* (6.24%). It was shown that the bacteria transforming amides and nitriles were found in all soils studied in an amount of  $10^5$ - $10^8$  CFU/g dry weight. The greatest number of isolates capable of growing on simple saline media belonged to the members of the genera *Rhodococcus* and *Pseudomonas*.

---

## ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ БАКТЕРИЙ ВЫСОКОМИНЕРАЛИЗОВАННЫХ ЭКОТОПОВ РАЙОНА СОЛЕРАЗРАБОТОК (Г. СОЛИКАМСК, ПЕРМСКИЙ КРАЙ)

Пьянкова А. А., Корсакова Е. С.

*ФГБУН Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь, Россия*

В высокоминерализованных образцах района промышленных солеразработок (г. Соликамск, Пермский край) выявлено разнообразие галофильных бактерий различных филогенетических групп. Значительный массив прокариот представлен галофильными бактериями семейства *Halomonadaceae* (роды *Chromohalobacter*, *Halomonas*). Также в исследуемых образцах обнаружены бактерии семейства *Idiomarinaceae* (род *Idiomarina*) и семейства *Vacillaceae* (род *Vacillus*). Выявлены бактерии, являющиеся потенциальными представителями новых таксонов.

**Ключевые слова:** ген 16S рРНК, галофильные бактерии, филогенетическое разнообразие.

**Актуальность и цель работы.** На территории Пермского края при промышленной добыче и переработке солей Верхнекамского месторождения (ВКМ) на поверхности складированных отходов производства в шламохранилищах и галитовых отвалах, содержание хлорида натрия в которых составляет более 90% [1]. Растворение материала отходов и вынос солей приводит к засолению прилегающей к ним территории, формируя условия для выживания галофильных бактерий. Данные бактерии перспективны для биотехнологических целей, а также в создании препаратов для биоремедиации засоленных почв и стоков. Применение современных молекулярно-генетических методов исследования позволяет достоверно определить систематическое положение выделенных бактерий, обнаружить новые формы микроорганизмов экстремальных местообитаний.

**Цель работы** – изучение таксономического разнообразия галофильных бактерий в высокоминерализованных отходах калийного производства (г. Соликамск, Пермский край).

**Материалы и методы.** Для исследования из района разработок ВКМ были отобраны образцы: соляная корка рассолосборника, донные отложения стока рассолосборника, галитовые отходы. Пробы отбирали с участков в непосредственной близости от солеотвала СКПРУ-2 предприятия ПАО «Уралкалий» (г. Соликамск, Пермский край).

Отбор, пробоподготовку и микробиологический анализ проводили общепринятыми методами [2]. Определение содержания катионов  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$  проводили как описано [3]. Выделение бактерий проводили методом накопительного культивирования на агаризованной модифицированной среде АТСС 213 «Halobacterium medium» следующего состава



ва (г/л): NaCl – 200,0, MgSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O – 10,0, KCl – 5,0, CaCl<sub>2</sub> x 6H<sub>2</sub>O – 0,2, дрожжевой экстракт («Difco», США) – 10,0, триптон («Fluka», США) – 2,5 ([www.atcc.org/~media/2DB3DC353E5E44A6BDB7CA5965614347.ashx](http://www.atcc.org/~media/2DB3DC353E5E44A6BDB7CA5965614347.ashx)).

Филогенетический анализ полученных изолятов был основан на определении нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК с применением набора реактивов Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit на автоматическом секвенаторе Genetic Analyser 3500XL («Applied Biosystems», США). Полученные нуклеотидные последовательности длиной около 800 п.н. были проанализированы с использованием программ CLUSTAL W, Sequence Scanner v1.0. Поиск гомологичных последовательностей проводили в базе данных EzTaxon (<http://www.ezbiocloud.net/eztaxon>).

**Результаты.** Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей 16S рДНК показал, что выделенные штаммы филогенетически близки к бактериям 2 классов: *Gammaproteobacteria* (роды *Chromohalobacter*, *Halomonas*, *Idiomarina*) и *Bacilli* (род *Bacillus*).

Наибольшее видовое разнообразие бактерий наблюдалось в донных отложениях стока рассолосборника на расстоянии 5 м от солеотвала. Суммарная концентрация Na<sup>+</sup> и K<sup>+</sup> составляла 65076 мг/кг образца. В донных отложениях выявлены бактерии семейства *Idiomarinaceae* (род *Idiomarina*) и семейства *Halomonadaceae* (род *Halomonas*), которые, как известно, устойчивы к экстремальным условиям существования [3]. Также обнаружены изоляты, имеющие значительное генетическое расстояние (уровень сходства по гену 16S рРНК составляет 97,45-98,52%) от штаммов узаконенных видов рода *Halomonas*. Таким образом, можно предположить, что ряд выделенных штаммов рода *Halomonas* могут представлять новые виды.

В образцах донных отложений стока рассолосборника на расстоянии 2 м от солеотвала и соляной корки рассолосборника обнаружены бактерии филогенетически близкие к представителям семейства *Halomonadaceae*. Повышенный уровень минерализации среды (суммарная концентрация Na<sup>+</sup> и K<sup>+</sup> составляла от 186205 до 207901 мг/кг образца) обуславливает наличие галофильных бактерий, представителей рода *Chromohalobacter*. Из галитовых отходов с суммарной концентрацией Na<sup>+</sup> и K<sup>+</sup> 222831 мг/кг образца выделены галофильные бактерии семейства *Bacillaceae* (род *Bacillus*). Из образцов донных отложений стока рассолосборника на расстоянии 5 м от солеотвала и галитовых отходов также выделены бактерии, имеющие низкий уровень сходства по гену 16S рРНК (92,21-92,39%) со штаммом узаконенного вида *Tuberibacillus calidus* (класс *Bacilli*), поэтому можно предположить, что данные культуры представляют собой новые таксономические единицы, требующие более подробного изучения.

Таким образом, в настоящей работе получены новые данные по филогенетическому разнообразию культивируемых галофильных бактерий из высокоминерализованных образцов района солеразработок ВКМ (г. Соликамск, Пермский край). Выявлены бактерии, являющиеся потенциальными представителями новых таксонов.

Работа поддержана грантом РФФИ-Урал № 13-04-96048 р\_урал\_a.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бабошко А. Ю., Бачурин Б. А. Горный информационно-аналитический бюллетень 2009, 5, 369-376.
2. Д. Г. Звягинцев (ред.) Методы почвенной микробиологии и биохимии, МГУ, Москва 1991.
3. Корсакова Е. С., Ананьина Л. Н., Назаров А. В., Бачурин Б. А., Плотникова Е. Г. Микробиология 2013, 2, 247-250.

## PHYLOGENETIC DIVERSITY OF BACTERIA FROM HIGHLY SALINIZED ECOTOPES OF SALT MINING REGION (SOLIKAMSK, PERM KRAI)

Ryankova A. A., Korsakova E. S.

*Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms UB RAS, Perm, Russia*

In highly salinized samples from the industrial salt-mining sites (Solikamsk, Perm Krai) there was revealed a diversity of halophilic bacteria of different phylogenetic groups. A significant number of prokaryotes were represented by halophilic bacteria of the family *Halomonadaceae* (genera *Chromohalobacter*, *Halomonas*). In addition, bacteria of the family *Idiomarinaceae* (genus *Idiomarina*) and family *Bacillaceae* (genus *Bacillus*) were identified in the samples. A proportion of the isolates may represent new taxonomic units.

## МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО НЕКРОТИЗИРУЮЩЕГО ФАКТОРА *YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS*

Псарева Е. К.<sup>1</sup>, Собянин К. А.<sup>2</sup>, Ермолаева С. А.<sup>2</sup>,  
Тимченко Н. Ф.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Г. П. Сомова, Владивосток;

<sup>2</sup>ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия

Цитотоксический некротизирующий фактор (CNF) является одним из токсинов *Yersinia pseudotuberculosis*, модифицирующих семейство Rho-белков. В настоящей работе представлены данные об обнаружении у *Y. pseudotuberculosis*, возбудителя дальневосточной скарлатиноподобной лихорадки, 2 аллелей гена *cnf* и дана молекулярно-генетическая характеристика этого гена в штаммах, изолированных в Российской Федерации от больных, грызунов и из объектов внешней среды в 1973–2014 годах.

**Ключевые слова:** *Yersinia pseudotuberculosis*, ген, цитотоксический некротизирующий фактор.

**Актуальность и цель работы.** Известно, что *Y. pseudotuberculosis* является факультативным внутриклеточным паразитом и характеризуется высоким адаптационным потенциалом [1]. Эти микроорганизмы выделены от людей, многих видов экто- и эндотермных животных, в том числе диких грызунов, из растений, объектов внешней среды (почва, вода), из продуктов питания. Патогенность *Y. pseudotuberculosis* является полидетерминантным признаком, который обеспечивает бактерии способность вызывать инфекционный процесс, проникая в организм. К настоящему времени известно, что *Y. pseudotuberculosis* продуцирует разные токсины, кодируемые генами хромосомы и плазмиды вирулентности [2].

Одним из этих токсинов является цитотоксический некротизирующий фактор (cytotoxic necrotizing factor – CNF), белок мол. массой 110–115 кДа [3]. Этот токсин принадлежит к уникальной группе крупных цитотоксинов, модифицирующих Rho-белки, которые являются регуляторами актинового цитоскелета клетки и активируют белки RhoA, путем деминирования Gln63. Сведения о молекулярно-генетической характеристике этого токсина в штаммах *Y. pseudotuberculosis*, циркулирующих в Российской Федерации, нами не обнаружены.

**Цель исследования:** представить молекулярно-генетическую характеристику ци-

тотоксического некротизирующего фактора *Y. pseudotuberculosis* в штаммах, изолированных в России.

**Материалы и методы.** В работе изучено 80 штаммов *Y. pseudotuberculosis*, выделенных от больных людей, грызунов и овощей в Российской Федерации (Дальний Восток, Сибирь, Европейская часть РФ) в 1973–2014 годах.

Ген *cnf* был амплифицирован, в присутствии Tag-полимеразы. Для исследования функционально-значимой области фрагмента гена *cnf* были использованы праймеры: 5'-GCAGGTGGGAGCAACAAGAT-3' и 3'-ACGGCGAACTTGATAATTGCTT-5' [3]. ПЦР проводили в термоциклере «Терцик» («ДНК-технология», Россия) по следующей программе: денатурация 1 цикл 95°C – 2 мин 30 сек, затем отжиг 25 циклов: 95°C – 40 сек, 56°C – 30 сек, 72°C – 2 мин и синтез 1 цикл 72°C – 7 минут 40 сек. Полученные ампликоны анализировали методом горизонтального электрофореза в 1% геле агарозы, содержащем бромистый этидий.

Далее проводили секвенирование гена *cnf* штаммов, представителей обеих аллелей, в Центре коллективного пользования «Геном» с подобранными в программе Oligo 7 Demo олигонуклеотидными праймерами: 5'-GTTGCAAACCTTCCGTCCCCA-3' в позиции 49, 3'-ACGGCGAACTTGATAATTGCTT-5'

в позиции 3118, из последовательности *cnf*, штамма YPIII, представленного в базе данных GenBank [3]. Результаты секвенирования анализировали программой «Chromas». Множественное выравнивание последовательностей осуществляли с помощью программы «ClustalX 2.1»

**Результаты.** Ранее, при исследовании варибельности 3'-концевой области гена *cnf*, кодирующего Rho-связывающий домен цитотоксического некротизирующего фактора *Y.pseudotuberculosis*, было выявлено два аллеля. Аллель 1 значительно преобладал и составил 99,2%. В названной области гена *cnf* обнаружена делеция размером 945 п.н., которая включала весь Rho – связывающий домен. Также обнаружено наличие второй делеции размером 300 п.н., находящейся вне функционально-значимой области *cnf* гена *Y.pseudotuberculosis* [4].

Определение полной последовательности гена *cnf* 1 аллеля из штамма *Y.pseudotuberculosis*, изолированного от больного, показало, что он содержит 2 делетированные области, указанные ранее, а также существенные замены, одна из которых – Т 355G приводит к образованию стоп-кодона.

Аллель 2 гена *cnf* был обнаружен лишь у одного штамма *Y.pseudotuberculosis* (0,8%), выделенного из внешней среды. Секвенирование амплифицированного гена *cnf* этого штамма показало, что он является полноразмерным, идентичным на 99,9% гену *cnf* *Y.pseudotuberculosis*, штамма YPIII, представленному в базе данных GenBank, и содержит 3 точечные мутации: А<sub>578</sub>G, А<sub>914</sub>G, G<sub>1183</sub>A, в результате кото-

рых в последовательности белка произошли аминокислотные замены Asn<sub>192</sub>Ser, Glu<sub>304</sub>Gly, Ala<sub>394</sub>Thr [5].

В результате исследований получена молекулярно-генетическая характеристика цитотоксического некротизирующего фактора штаммов *Y.pseudotuberculosis*, изолированных в РФ. Информация об аллелях гена *cnf* *Y.pseudotuberculosis* зарегистрирована в базе данных GenBank. KR028010-KR028011.

Установлено, что 99,2% штаммов имели 1 аллель гена *cnf* *Y.pseudotuberculosis*, содержащие 2 делетированные области и существенные замены, одна из которых – Т 355G приводит к образованию стоп-кодона. Полноценный ген *cnf* обнаружен лишь у 1 штамма (0,8%), выделенного из внешней среды. В связи с полученными данными, остается открытым вопрос о роли CNF токсина в патогенности *Y.pseudotuberculosis*.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Сомов Г.П., Бузолева Л.С. Адаптация патогенных бактерий к абиотическим факторам окружающей среды. Примполиграфкомбинат, Владивосток 2004
2. Тимченко Н.Ф. Бюллетень СО РАМН 2011, 31 (4), 93-99
3. Lockman H. A., Gillespie R. A., Baker B. D. et al. Infect Immun 2002, 70 (5), 2708-2714
4. Персиянова Е. В., Адгамов Р. Р., Сурин А. К., Псарева Е. К., Ермолаева С. А., Тимченко Н. Ф. Бюллетень СО РАМН 2013, 33 (2), 16-20
5. Псарева Е. К., Тимченко Н. Ф., Собянин К. А., Смирнова Н. В., Ермолаева С. А. Материалы конференции «Инфекция и иммунитет». Санкт-Петербург 2014, 87

#### THE MOLECULAR-GENETIC CHARACTERISATION OF CYTOTOXIC NECROTIZING FACTOR OF *YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS*

Psareva E. K.<sup>1</sup>, Sobyenin K. A.<sup>2</sup>, Ermolaeva S. A.<sup>2</sup>, Timchenko N. F.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok; <sup>2</sup>Gamaleya Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia

The cytotoxic necrotizing factor (CNF) of *Yersinia pseudotuberculosis* belongs to a family of protein toxins that constitutively activate small GTPases of the Rho family. This work presents 2 allele of *cnf* of the strains that were isolated from the stool of patients with clinical signs of Far East scarlet-like fever, from the vegetables and from the rodents. All strains were isolated in Russia (Siberia, Far East, Europe) in 1973-2014 and their molecular genetic characteristics are presented.

## МИКРОБНО-ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПОЧВЫ, ДЛИТЕЛЬНОЕ ВРЕМЯ ЗАГРЯЗНЕННОЙ ХЛОРОРГАНИЧЕСКИМИ ПОЛЛЮТАНТАМИ

Пьянкова А. А.<sup>1</sup>, Андреев Д. Н.<sup>2</sup>, Егорова Д. О.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН;

<sup>2</sup>Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

Изучен уровень токсичности и микробного разнообразия образцов почв кварталов 11 и 32 ООПТ «Осинская лесная дача», в которых длительное время (более 40 лет) присутствуют хлорорганические вещества группы «Стойкие органические загрязнители». Показано, что водные вытяжки исследуемых почв оказывают среднетоксическое действие на *Chlorella vulgaris* Beijer. Для *Daphnia magna* Straus установлено острое токсическое действие образцов квартала 11, и отсутствие токсического воздействия образцов квартала 32. Все почвенные образцы характеризуются высоким уровнем микробного разнообразия. При этом из 30 описанных морфотипов только 3 присутствуют во всех почвенных образцах. Показано, что данные морфотипы различаются и на генетическом уровне.

**Ключевые слова:** СОЗ, штаммы, токсичность, почва.

**Актуальность и цель работы.** Сохранение окружающей среды и восстановление уже загрязненных территорий является одним из приоритетных направлений в настоящее время. Производство и широкое применение в течение длительного времени соединений хлорорганического ряда привело к загрязнению ими обширных территорий. В связи с этим, а также из-за высокой токсичности соединений данного класса для живых организмов, мировым сообществом принят ряд документов направленных на очистку окружающей среды. Одним из таких документов является ратифицированная в 176 странах, в том числе в РФ, Стокгольмская конвенция об уничтожении Стойких органических загрязнителей (СОЗ) [1, 2].

Реализация положений данной конвенции предполагает оценку уровня опасности почв, загрязненности соединениями группы СОЗ, разработку технологий по уничтожению СОЗ и технологий по ремедиации загрязненных объектов. Одними из основных показателей возможности восстановления почвы являются уровень ее токсичности, а также микробное разнообразие.

**Цель работы** – проанализировать состояние почвы, более 40 лет загрязненной соеди-

нениями группы «Стойкие органические загрязнители», и дать оценку перспективности ее ремедиации.

**Материалы и методы.** Образцы почв отобраны с территории ООПТ «Осинская лесная дача» в точках 57°17'16,861"N 55°09'0,13"E (квартал 32, выдел 9), 57°17'25,994"N 55°08'21,998"E (квартал 32, выдел 11), 57°18'33,733"N 55°10'39,343"E (квартал 11, выдел 1). В период 1968–1970 гг. данная территория была обработана инсектицидными препаратами хлорорганического ряда марок «Гексохлоран» и «ДДТ».

Пробоотбор осуществлен в соответствии с государственной нормативной документацией (ГОСТ 12071-2000, ГОСТ 17.4.3.01-83, ПНД Ф 12.1:2:2.2:3.2-03). Все образцы отобраны по методу «конверта» с соблюдением правил асептики в радиусе 100 м от указанной точки. Для дальнейшего анализа брали усредненную пробу.

Уровень токсичности образцов почв определяли элюатными методами биотестирования по методикам, зарегистрированным в реестре природоохранной нормативной документации (ПНД Ф 14.1:2:4.16-09 16.1:2.3.3.14-09; ФР.1.31.2012.12372; ФР.1.39.2007.03222; ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.10-04 Т 16.1:2.3:3.7-04), рекомендованным для целей государственного

экологического контроля с использованием тест-объектов различных таксономических групп (*Chlorella vulgaris* Beijer, *Daphnia magna* Straus).

Острое токсическое действие исследуемых водных вытяжек из почвенных образцов на дафний определяли по их смертности за определенный период экспозиции. Критерием острой токсичности служила гибель 50% и более дафний за 48 часов в исследуемой пробе при условии, что в контрольном эксперименте все рачки сохраняли свою жизнеспособность.

Маточную культуру дафний выращивали в Климатостате Р-2 согласно «Методике определения токсичности воды и водных вытяжек из почв, осадков сточных вод, отходов по смертности и изменению плодовитости дафний» (ФР.139.2001.00283). Биотестирование водных вытяжек проводили только на синхронизированной культуре дафний (одновозрастная культура, полученная от одной самки путем ациклического партеногенеза в третьем поколении). Учет смертности дафний в опыте и контроле проводили через 1 час и каждые 24 часа.

Определение токсичности каждой пробы без разбавления и после каждого разбавления проводили в трех параллельных сериях. В качестве контроля использовали три параллельные серии с культивационной водой.

Микробное разнообразие изучали с применением классических микробиологических методов (накопительное культивирование, рассев до чистых культур, описание морфологии колоний и клеток), а также генетических методов (типирование с применением RFLP и ВОХ-ПЦР).

**Результаты.** Токсикологический анализ почв кварталов 11 и 32, обработанных препаратами «Гексохлоран» и «ДДТ» в 1968–1970 гг., с применением *Chlorella vulgaris* Beijer показал, что все образцы среднетоксичны (3 степень из 6 возможных). Вытяжки из почв проявляют токсическое действие без разбавления и при разбавлении в 3 раза. При дальнейшем разбавлении токсическое действие не наблюдается.

Установлено, что образцы почв квартала 11 вызывают острую токсическую реакцию тест-объекта *Daphnia magna* Straus. При этом средняя летальная концентрация водной вытяжки почв данного квартала, вызывающая гибель

50% и более тест-организмов (ЛКР<sub>50-48</sub>) составила 141,25%, а безвредная кратность разбавления водных вытяжек, вызывающую гибель не более 10% тест-объектов за 48-часовую экспозицию (БКР<sub>10-48</sub>) – 16,77%. Водные вытяжки почв квартала 32 не оказали токсического действия на *Daphnia magna* Straus.

Микробиологический анализ почв показал, что в них присутствует значительное количество штаммов бактерий. В результате посева накопительных культур установлен высокий уровень разнообразия бактериальных штаммов, описано 30 морфотипов, отличающихся морфологией колоний и клеток. Установлено, что три морфотипа присутствуют во всех образцах почв:

морфотип 3 – колонии круглые, выпуклые, блестящие, не прозрачные, грязно-белые с желтым оттенком, 2-4мм диаметром; 4% от общего количества КОЕ в образцах почв квартала 32, < 1% – в образцах почв квартала 11.

морфотип 8 – колонии круглые, ровные, каплевидные, матовые, желто-оранжевые, не прозрачные, структура мелкозернистая, 1-2 мм в диаметре; 37% от общего количества КОЕ в образцах почв квартала 32, 88% – в образцах почв квартала 11;

морфотип 15 – колонии круглые, края с концентрическими кругами, в центре колония шероховатая, к краям гладкая, выпуклая, не прозрачная, бежевая, 7-9мм в диаметре; 56% от общего количества КОЕ в образцах почв квартала 32, 4% – в образцах почв квартала 11.

ДНК-типирование показало, что выделенные морфотипы отличаются друг от друга и на генетическом уровне.

Таким образом, выявленный уровень токсичности почв для растительных и животных тест-объектов, а также высокий уровень бактериального разнообразия позволяет предположить возможность эффективной ремедиации почв кварталов 11 и 32 ООПТ «Осинская лесная дача».

Работа поддержана грантом РФФИ-Урал № 14-04-96021p\_урал\_a.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. <http://chm.pops.int>
2. Федеральный закон РФ № 164-ФЗ

## MICROBIAL-TOXICOLOGICAL ANALYSIS OF SOIL CONTINUOUSLY POLLUTED BY ORGANOCHLORINE SUBSTANCES

Pjankova A. A.<sup>1</sup>, Andreev D. N.<sup>2</sup>, Egorova D. O.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Institute of Ecology and Genetic of Microorganisms, RAS;

<sup>2</sup>Perm State University, Perm, Russia

The level of toxicity and microbial diversity of soil samples from quarters 11 and 32 PAs "Osinskaya forest cottage", which for a long time (over 40 years) have been containing the organochlorine group of "Persistent organic pollutants" was studied. It was shown that aqueous extracts of investigated soils had on the average a toxic effect on *Chlorella vulgaris* Beijer. For *Daphnia magna* Straus acute toxic effects of samples from quarter 11, and the absence of toxic effects of samples from quarter 32 was found. All soil samples were characterized by high levels of microbial diversity. Of 30, only 3 described morphotypes were present in all soil samples. It was shown that these morphotypes differed at the genetic level.

## СОСТАВ АЛЬГО-БАКТЕРИАЛЬНОГО СООБЩЕСТВА ЭПИЛИТОНА ПРЕДГОРНОЙ РЕКИ СЫЛВА

Семейкина П. И.<sup>1</sup>, Беляева П. Г.<sup>1</sup>, Козяева В. В.<sup>2</sup>,  
Кузнецов Б. Б.<sup>2</sup>, Саралов А. И.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБУН Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь;

<sup>2</sup>ФГБУН Центр «Биоинженерия» РАН, Москва, Россия

Разнообразие бактерий и водорослей в эпилитоне предгорной р. Сылва оценено с использованием общепринятых в альгологии методов и анализа последовательностей генов 16S рРНК. В перифитоне выявлено 102 таксона водорослей из 6 отделов. Диатомовые водоросли составляли более 90% общей численности и 86% биомассы. С помощью методов молекулярной экологии идентифицированы лишь хлоропласты и клоны, филогенетически сходные с диатомеями рода *Symbella*. По результатам филогенетического анализа выявлено 34 ОТУ, относящихся к 7 бактериальным филам. Наиболее многочисленными оказались представители филы Proteobacteria (23 ОТУ). Большинство идентифицированных последовательностей 16S рРНК проявляли гомологию именно с культивируемыми бактериями из различных пресноводных мест обитания.

*Ключевые слова:* эпилитон, водоросли, Proteobacteria, клонирование.

**Актуальность и цель работы.** Современные исследования альго-бактериальных сообществ обрастающих каменистых субстратов (эпилитон) и макрофитов (эпифитон) речных экосистем направлены на их комплексный анализ, включающий изучение функциональной роли перифитона, учет численности микроорганизмов методами прямого счета или предельных разведений на питательных средах, выделение чистых культур, молекулярную *in situ* детекцию прокариот и водорослей [1–4]. Фито- и бактериоперифитону водотоков Камского бассейна, в частности в наиболее изученной предгорной р. Сылва, принадлежит ведущее положение

в самоочищении и биопродуктивности, азотфиксации и денитрификации [1, 2]. В последние десятилетия за рубежом начаты исследования разнообразия сообществ эукариот и прокариот в речных биопленках с использованием молекулярно-генетических методов *in situ*, позволяющих выявить отдельные клетки без использования методов культивирования [3–4].

**Цель данной работы** – оценка разнообразия бактерий и водорослей с использованием общепринятых в альгологии методов и филогенетического анализа нуклеотидных последовательностей 16S рРНК в образцах эпилитона р. Сылва.

**Материалы и методы.** Каменистые субстраты среднего течения р. Сылва занимают 70% его площади, состоят из валунов диаметром 0.1–1.5 м, гальки (1–10 см), гравия (0.1–1 см), песка (< 0.1 см). Пробы эпилитона отбирали в начале августа 2014 г. в среднем течении р. Сылва выше г. Кунгура в районе учебно-научной базы «Предуралье» Пермского университета. Альгологические пробы отбирали и обрабатывали по общепринятым методикам, описанным нами ранее [1]. Общую численность клеток бактериоэпилитона ( $N_6$ ) определяли методом эпифлуоресцентной микроскопии с окрашиванием их ДНК-специфичным флуоресцентным красителем ДАФИ (4',6'-диамино-2-фенилиндо́л). Тотальную ДНК экстрагировали из природных проб, используя набор реактивов «PowerSoil DNA extraction kit» (MoBio, Laboratories, USA). Фрагменты генов, кодирующих 16S рРНК, амплифицировали в полимеразной цепной реакции (ПЦР), используя праймерные пары 27f и 1492r, 27f и 1100r, 27f и 519r [5]. Очищенные ПЦР фрагменты клонировали в векторе pGEM-T (Promega, USA) в компетентных клетках *Escherichia coli* ДН5а. Фрагменты клонов секвенировали на ДНК анализаторе ABI 3730 (Applied Biosystems, USA). Первичный анализ нуклеотидных последовательностей ПЦР фрагментов выполняли с использованием онлайн сервиса NCBI BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>). Построение филогенетических деревьев проводили при помощи программного пакета MEGA5.0.

**Результаты.** В августе 2014 г. общая численность водорослей в эпилитоне достигала  $5 \times 10^{10}$  кл/м<sup>2</sup> ( $N_6 - 6 \times 10^{12}$  кл/м<sup>2</sup>), их биомасса – 28 г/м<sup>2</sup>. В перифитоне выявлено 102 таксона водорослей рангом ниже рода (97 видов) из 6 отделов: Bacillariophyta – 67, Chlorophyta – 24, Cyanophyta – 7; Chrysophyta – 2; Euglenophyta – 1; Cryptophyta – 1. Сообщество сформировалось преимущественно диатомовыми, зелеными и синезелеными водорослями. Среди синезеленых наиболее многочисленными были представители родов *Gloeocapsa*, *Merismopedia*, *Anabaena*, *Lyngbya*, *Oscillatoria*, среди зеленых – *Scenedesmus*, *Cosmarium* и *Pediastrum*. Диатомеи составляли 90% общей численности водорослей и 86% – биомассы. Летний максимум биомассы формировался при доминировании 7 видов диатомей (*Navicula cryptocephala*, *Synedra ulna*, *Cocconeis placentu-*

*la*, *Cymbella lanceolata*, *C. turgidula*, *C. cistula*, *C. ventricosa*). Эти виды характерны также для обрастаний макрофитов и искусственных субстратов [1].

Система универсальных эубактериальных праймеров, использованная для амплификации фрагментов генов 16S рРНК из образцов эпилитона, не рассчитана на детекцию разнообразных водорослей домена Eukaryota. Тем не менее, применение этих праймеров позволило выявить наличие хлоропластной ДНК в исследуемых образцах, представленной в виде четырех клонов Bacillariophyta и ряда клонов, филогенетически сходных с крупноразмерными перифитонными диатомеями рода *Cymbella*, в частности *Cymbella subturgidula* clone D53 (EU580516).

Бактериальное сообщество эпилитона по результатам анализа клонок гена 16S рРНК, напротив, было идентифицировано очень эффективно. Рассмотрено 145 последовательностей, 133 из которых были включены в дальнейший анализ после удаления химер. Нуклеотидные последовательности при их 97%-ной и более гомологии объединялись в операционные таксономические единицы (ОТУ). По результатам филогенетического анализа выявлено 34 ОТУ, относящихся к 7 бактериальным филлам домена Bacteria. В сообществе наиболее многочисленными оказались представители филы Proteobacteria (29 ОТУ), включающие в себя классы Gammaproteobacteria (8 ОТУ), Betaproteobacteria (8 ОТУ), Alphaproteobacteria (7 ОТУ). Выявлены также последовательности иных филогенетических ветвей, относящихся к филлам Firmicutes (3 ОТУ), Bacteroidetes (2) и Fusobacteria (2). Единичными последовательностями были представлены филы Verrucomicrobia и Planctomycetes.

Следует особо отметить, что большинство идентифицированных последовательностей генов 16S рРНК проявляли гомологию с последовательностями именно культивируемых бактерий из различных пресноводных мест обитания. Однако в исследованных ранее прокариотных сообществах эпилитона ряда рек различных климатических зон обнаружено значительно более массовое распространение некультивируемых представителей фил Proteobacteria и Bacteroidetes (группа Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides), родственных индифферентным микроорганизмам донных отложений, почв и геологических формаций [3, 4].

Фила Proteobacteria в эпилитоне р. Сылва представлена тремя классами  $\alpha$ -,  $\beta$ - и  $\gamma$ -Proteobacteria, которые на филогенетическом древе с высокой степенью достоверности формировали обособленные кластеры высокомологичных последовательностей. Протеобактерии этих классов являются космополитами и, как правило, многочисленны в 16S-клонотеках морских и пресноводных экосистем [3–5]. Отдельные подгруппы видов внутри кластеров могут иметь исключительно высокий уровень сходства по последовательностям нуклеотидов гена 16S рРНК (более 98%), но обладать различными типами обмена веществ. Они характеризуются физиологическим многообразием, включают фото- и хемолито-автотрофные, факультативно автотрофные и различные хемотрофные виды, обладающих способностью к азотфиксации и/или денитрификации. Так, в классе Alphaproteobacteria выявлены клоны, близкородственные с фототрофными пурпурными несерными бактериями (ПНБ) *Rhodobacter capsulatus* DSM1710<sup>T</sup> (D16428). ПНБ *Rhodobacter* spp. широко распространены в обрастаниях подводных субстратов р. Сылва и водотоков разного генезиса Камского бассейна, играют важную роль в процессах самоочищения исследуемых природных и сточных вод от соединений углерода, азота и металлов, реализуют свой потенциал к денитрификации в речном эпилитоне *in situ* [1, 2]. В чистую культуру

выделены штаммы ПНБ, имеющие по совокупности фенотипических и генотипических признаков высокий уровень сходства с *Rhodobacter capsulatus*, *R. spheroids*, *R. azotformans* *R. blasticus* [2]. Следует отметить, что практически все выявленные в сообществе эпилитона р. Сылва последовательности 16S рРНК протеобактерий обладали высокой степенью сходства с последовательностями именно культивируемых бактерий из различных пресноводных мест обитания.

Данная работа поддержана Программой УрО РАН «Молекулярная и клеточная биология» (№ 01200963684) и осуществлена с использованием уникального оборудования ЦКП «Биоинженерия» РАН (Москва).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Беляева П. Г., Саралов А. И., Чикин С. М., Банникова О. М. Биология внутренних вод 2007, 3, 32-40.
2. Саралов А. И., Галямина В. В., Беляева П. Г., Мольков Д. В. Биология внутренних вод 2010, 2, 13-19.
3. O'Sullivan L.A., Weightmann A. J., Fry J.C. Appl Environ Microbiol 2002, 68, 201-210.
4. Bricheux G., Morinh., Le Moal G., et al. Microbiol Open 2013, 2 (3), 402-414.
5. Lane D.J. 16S/23S sequencing. In: Nucleic acid techniques in bacterial systematics. Stackebrandt E., Goodfellow M. (eds.), John Wiley & Sons, Ltd., Chichester 1991, 115-175.

#### ALGO-BACTERIAL COMMUNITY COMPOSITION IN EPILITHON OF SUBMOUNTAIN SYLVA RIVER

Semeikina P. I.<sup>1</sup>, Belyaeva P. G.<sup>1</sup>, Koziaeva V. V.<sup>2</sup>, Kuznetsov B. B.<sup>2</sup>, Saralov A. I.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms UB RAS, Perm;

<sup>2</sup>Centre "Bioengineering" Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

Bacterial and algal diversity was evaluated in the epilithon of the submountain Sylva River using conventional methods and analysis of 16S rRNA gene sequences. Periphyton comprised 102 algal taxa out of 6 groups. Diatoms constituted more than 90% of the total number of algae and 86% of biomass. Methods of molecular ecology offered the identification of only chloroplasts and clones that were phylogenetically similar to diatoms of genus *Cymbella*. Based on data of phylogenetic analysis 34 OTUs were revealed that belonged to 7 bacterial phyla. The most abundant group was related to Proteobacteria phylum (23 OTUs). Most of the identified 16S rRNA sequences demonstrated high level homology to those of cultured bacteria from different freshwater habitats.



## ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО ШТАММА *BACILLUS SUBTILIS* 168, НЕСУЩЕГО ШАТТЛ-ВЕКТОР С ГЕНОМ РИБОНУКЛЕАЗЫ *BACILLUS LICHENIFORMIS* ATCC 14580

Сокуренок Ю. В., Ульянова В. В., Ильинская О. Н.

ФГАОУВПО Казанский (Приволжский) федеральный университет,  
Казань, Россия

РНКазаы находят применение в генной инженерии, молекулярной биологии и биотехнологии. Перспективный аспект использования микробных РНКаз связан с лечением опухолей и вирусных инфекций. В данной работе был получен штамм *Bacillus subtilis* 168, несущий ген РНКазы *Bacillus licheniformis* ATCC 14580 и ее ингибитора на плазмиде, и показано, что РНКазы *B. licheniformis* эффективно синтезировались в рекомбинантном штамме. Полученная система на основе рекомбинантного штамма *B. subtilis* позволит установить механизмы регуляции экспрессии малоизученной РНКазы *B. licheniformis* с целью дальнейшего целенаправленного воздействия на продукцию фермента.

*Ключевые слова:* рибонуклеазы, бациллы, рекомбинантный штамм, шаттл-вектор.

**Актуальность и цель работы.** Рибонуклеазы являются важными ферментами метаболизма РНК. Они находят применение в генной инженерии, молекулярной биологии и биотехнологии. Перспективный аспект использования микробных РНКаз связан с лечением раковых опухолей и вирусных инфекций.

Эндоспорообразующие непатогенные грамположительные бактерии *Bacillus licheniformis* широко используются для крупномасштабного производства экзоферментов (протеаз, α-амилаз, пенициллиназ, ксиланаз) и пептидных антибиотиков [1]. Вместе с тем до сих пор в литературе практически нет сведений о наличии внеклеточных РНКаз у этого вида бацилл. С помощью средств биоинформатики в геноме *B. licheniformis* ранее нами была обнаружена последовательность, имеющая сходство с генами низкомолекулярных гуанилспецифичных РНКаз *B. amyloliquefasciens* (барназы) и *B. pumilus* (биназы). По результатам сравнительного анализа нуклеотидных и аминокислотных последовательностей низкомолекулярная РНКазы *B. licheniformis* не может быть отнесена ни к группе барназоподобных, ни к группе биназоподобных РНКаз. Исследование свойств новой РНКазы и выяснение механизмов регуляции экспрессии ее гена имеют важное фундаментальное и практическое значение. В связи

с этим целью данной работы стало получение рекомбинантного штамма *B. subtilis*, несущего шаттл-вектор с генами внеклеточной низкомолекулярной РНКазы *B. licheniformis* и ее внутриклеточного ингибитора.

**Материалы и методы.** В работе использовали штаммы *B. licheniformis* ATCC 14580, *Escherichia coli* DH5α и *B. subtilis* 168. Для получения рекомбинантных конструкций были использованы плазмиды рВР (~ 3,2 тыс. п.о.) и рUB110 (~ 4,5 тыс. п.о.).

Фрагмент геномной ДНК *B. licheniformis* ATCC 14580, содержащий гены РНКазы и ее ингибитора, был амплифицирован с помощью ПЦР с использованием пары праймеров Bli-For (gagtgagaattcggcgcaaaaggaactttacc) и Bli-Rev (cagtacaagcttacgaaagaggatgtgaatgc). Плаزمида рВР была рестрицирована по сайтам HindIII и EcoRI, после чего фрагмент большего размера (около 2,2 тыс. п.о.) был выделен и очищен из агарозного геля. Полученный фрагмент плазмидной ДНК лигировали с очищенным ПЦР продуктом, также предварительно рестрицированным по сайтам HindIII и EcoRI. Лигазной смесью был трансформирован штамм *E. coli* DH5α. Выделенная из рекомбинантного штамма *E. coli* плазмиды и вектор рUB110 были рестрицированы по сайту EcoRI, очищены из агарозного геля и лигиро-

ваны. Полученной генетической конструкцией трансформировали штамм *B. subtilis* 168.

**Результаты.** Гены низкомолекулярной РНКазы *B. licheniformis* ATCC 14580 и ее природного ингибитора были амплифицированы с геномной ДНК. Был получен фрагмент размером 1,134 тыс. п.о.

Важным этапом в изучении свойств РНКазы *B. licheniformis* является создание генно-инженерной конструкции, содержащей ген исследуемой РНКазы. Для этого на первом этапе было проведено клонирование амплифицированного фрагмента в штамм *E. coli* DH5 $\alpha$ . В качестве вектора для клонирования была выбрана плаزمида рVP. Содержащийся в ней полный ген РНКазы *B. pumilus* мы заменили на амплифицированный фрагмент генома *B. licheniformis*, содержащий гены РНКазы и ее ингибитора. Полученной конструкцией были трансформированы компетентные клетки *E. coli* DH5 $\alpha$ .

Вторым этапом клонирования стало получение шаттл-вектора, несущего ген РНКазы *B. licheniformis*, для его экспрессии в клетках *B. subtilis*. Шаттл-вектор был сконструирован путем комбинации полученной конструкции с плазмидным вектором рUB110, необходимым для экспрессии чужеродных генов в *B. subtilis*.

В результате была получена плаزمида размером около 8 тыс. п.о. Полученной плазмидой был трансформирован штамм *B. subtilis* 168.

**Обсуждение.** Нами был получен штамм *B. subtilis* 168, несущий на плазмиде ген РНКазы *B. licheniformis* ATCC 14580 и ген ее внутриклеточного ингибитора. Показано, что РНКазы *B. licheniformis* эффективно синтезировалась в рекомбинантном штамме. Таким образом, на основе бактерии *B. subtilis* мы получили

систему, экспрессирующую малоизученную РНКазу *B. licheniformis* ATCC 14580. В дальнейшем мы планируем встроить полученную конструкцию в штаммы *B. subtilis*, дефектные по различным регуляторным белкам, для изучения механизмов регуляции новой низкомолекулярной РНКазы. Несмотря на то, что виды *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. pumilus*, *B. subtilis* являются близкородственными и имеют сходные регуляторные системы, регуляторные механизмы, контролирующие продукцию гомологичных ферментов, у них различаются. Так, синтез барназы, в отличие от биназы, не подвержен влиянию неорганического фосфата и зависит от ключевого многофункционального белка стационарной фазы роста Spo0A [2]. Знание молекулярных механизмов регуляции синтеза РНКазы позволит осуществлять целенаправленное воздействие на ее продукцию. Для этого нами будет разработана система экспрессии на основе бациллярных штаммов, так как она имеет ряд преимуществ перед системами на основе *E. coli*, основные недостатки которых заключаются, в первую очередь, в наличии экзотоксина и в низкой секреции белков [3, 4].

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Waschkau B., Waldeck J., Wieland S., Eichstädt R., Meinhardt F. Appl Microbiol Biotechnol 2008, 78, 181-188.
2. Ulyanova V., Vershinina V., Ilinskaya O. FEBS Journal 2011, 278, 3633-3643.
3. Demain A., Vaishnav P. Biotechnol Advances 2009, 27, 297-306.
4. Schallmeyer M., Singh A., Ward O. Can J Microbiol 2004, 50, 1-17.

### OBTAINING OF RECOMBINANT STRAIN OF *BACILLUS SUBTILIS* 168 CARRYING THE SHUTTLE VECTOR WITH THE GENE OF RNASE OF *BACILLUS LICHENIFORMIS* ATCC 14580

Sokurenko Yu.V., Ulyanova V.V., Ilinskaya O.N.

Kazan (Volga region) Federal University, Kazan, Russia

RNases are used in genetic engineering, molecular biology and biotechnology. The promising aspect of the use of microbial RNases is associated with the treatment of tumors and viral infections. We obtained the strain of *Bacillus subtilis* 168, carrying the gene of RNase of *B. licheniformis* ATCC 14580 and its inhibitor on the plasmid. It was shown that RNase of *B. licheniformis* was efficiently synthesized in the recombinant strain. The system based on recombinant strain of *B. subtilis* will allow to establish the mechanisms of regulating of the expression of insufficiently explored RNase of *B. licheniformis* for the purpose of further targeted impact on the production of enzyme.

## ВИДОВОЕ РАЗНООБРАЗИЕ АКТИНОБАКТЕРИЙ ИЗ ЭКОСИСТЕМ С ДЕФИЦИТОМ ВЛАГИ

Стародумова И. П.<sup>1,2</sup>, Присяжная Н. В.<sup>1</sup>, Арискина К. И.<sup>3</sup>,  
Дорофеева Л. В.<sup>1</sup>, Автух А. Н.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Всероссийская коллекция микроорганизмов (ВКМ), Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрыбина РАН, Пущино; <sup>2</sup>Пущинский государственный естественно-научный институт, Пущино; <sup>3</sup>Факультет почвоведения, Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия

Проведено таксономическое изучение 110 штаммов корине- и нокардиоформных актинобактерий, выделенных из различных экосистем, характеризующихся дефицитом доступной влаги. На основании результатов МАЛДИ масс-спектрометрии, анализа генов 16S рРНК и  $\beta$ -субъединицы ДНК-гиразы (*gyrB*) и фенотипических признаков, изученные штаммы отнесены к известным и более чем к 20 новым видам (подвидам) 12 родов актинобактерий.

**Ключевые слова:** коринеформные и нокардиоформные актинобактерии, МАЛДИ масс-спектрометрия, 16S рРНК, *gyrB*.

**Актуальность и цель работы.** Корине- и нокардиоформные актинобактерии составляют значительную часть микробных сообществ в экосистемах, характеризующихся дефицитом доступной влаги в течение продолжительного периода времени (степи, сухие степи, полупустыни и пустыни) [1]. Исследование актинобактерий из таких экосистем представляет интерес, прежде всего, в связи с оценкой биоразнообразия на планете и высоким биотехнологическим потенциалом организмов этой группы. Актинобактерии, в частности, являются продуцентами многих биологически-активных соединений, используемых в медицине.

Современные методы позволяют значительно интенсифицировать процесс идентификации больших массивов микроорганизмов, а также идентифицировать штаммы, сходные на фенотипическом и филогенетическом (16S рРНК) уровнях. Среди таких методов, помимо молекулярно-биологических, выделяется метод МАЛДИ масс-спектрометрии – высокопроизводительный метод с высоким уровнем таксономического разрешения [2, 3]. В основе метода лежит сравнение масс-спектров смеси компонентов разрушенных клеток. Компоненты МАЛДИ-спектров в диапазоне масс 2000–20000 *m/z* соответствуют полярным протеинам цитоплазмы, в основном, рибосомальным. Достоинством метода являются бы-

строота анализа и малое количество материала (достаточной одной колонии). Вместе с тем, в доступных базах данных отсутствуют спектры типовых штаммов многих видов микроорганизмов [2].

**Цель работы** – оценка видовой разнообразия коллекции корине- и нокардиоформных актинобактерий, изолированных из различных экосистем с дефицитом доступной влаги, с использованием МАЛДИ масс-спектрометрии, молекулярно-биологических методов и традиционных подходов.

**Материалы и методы.** Объектами исследования были 110 штаммов корине- и нокардиоформных актинобактерий, выделенных из различных растений и почв (Оренбургская обл., Волгоградская обл., Белгородская обл., Узбекистан, Туркменистан, Австралия, Израиль). Штаммы выращивали на агаризованных средах R2A, DSM 65 и ISP 9 при 28 °С в течение 2–5 сут. Анализ методом МАЛДИ масс-спектрометрии проводили на приборе Autoflex Speed (Bruker Daltonics, Германия) с помощью программ Flex analysis 3.3 и Biotyper 3.0 (Bruker Daltonics, Германия) по описанной ранее методике [4]. Для амплификации фрагментов генов 16S рРНК использовали универсальные бактериальные праймеры 27F, 1492R и 1525R. Фрагменты генов  $\beta$ -субъединицы ДНК-гиразы (*gyrB*) амплифицировали с использованием

известных праймеров (для *Kribbella*, *Clavibacter*) и разработанных нами (для *Rathayibacter*). Филогенетический анализ проводили с помощью программы MEGA 6.0.

**Результаты.** По результатам анализа фрагментов генов 16S рРНК (700-1500 п.н.) установлено, что исследуемая коллекция изолятов включает представителей 12 родов порядка *Actinomycetales* (*Agromyces*, *Arthrobacter*, *Cellulomonas*, *Clavibacter*, *Curtobacterium*, *Geodermatophilus*, *Kribbella*, *Microbacterium*, *Modestobacter*, *Nocardioides*, *Rathayibacter* и *Rhodococcus*). Значительная часть культур имеет высокое сходство генов 16S рРНК (более 99%) с типовыми штаммами валидно описанных видов. Ряд культур формирует отдельные филогенетические ветви в пределах исследуемых родов (уровень сходства 16S рРНК менее 98%).

Для всех штаммов были получены МАЛДИ масс-спектры, содержащие до 120 пиков с массами 2000–20000 m/z. Кластерный анализ спектров выявил значительное число групп предположительно видового уровня, в том числе, среди филогенетически близких (16S рРНК) штаммов. Эти группы обособлялись от МАЛДИ-кластеров, включающих типовые штаммы валидно описанных видов.

С целью уточнения видовой принадлежности представителей ряда таких групп и оценки порогового значения уровня сходства МАЛДИ-спектров для штаммов одного вида (подвида) были проанализированы нуклеотидные последовательности фрагментов генов *gyrB* для культур отдельных родов (*Kribbella*, *Clavibacter* и *Rathayibacter*). Основываясь на полученных результатах и данных литературы, можно заключить, что культуры, формирующие группы, обособленные от МАЛДИ-кластеров типовых штаммов, представляют собой не менее 20 новых видов и подвидов.

Представители ряда выявленных новых видов характеризуются уникальными свойствами, ранее не известными для представителей соответствующих родов или бактерий в целом. Так, например, у двух видов *Kribbella* обнаружены спорангиеподобные репродуктивные структуры, состоящие из плотных конгломератов полиморфных клеток разного размера, формирующихся путем деления септами в продольном и поперечном направлениях. Впервые в клеточной стенке криббелл найдены мадуроза и 2,3-ди-О-метил-D-галактоза, а также ранее не известные теихулозоновые кис-

лоты [5]. «Пустынные» розово-окрашенные штаммы (представители нескольких новых, предположительно непатогенных подвидов вида *Clavibacter miciganensis*) содержат в клеточной стенке гликополимеры новой структуры и образуют ряд бактериоцинов, подавляющих рост возбудителей сосудистых заболеваний томата, люцерны, кукурузы, фасоли, картофеля, пшеницы.

На основании полученных результатов предложен метод ускоренной диагностики бактерий фитопатогенных видов/подвидов родов *Clavibacter* и *Rathayibacter*. Созданы референтные базы данных МАЛДИ масс-спектров штаммов вышеупомянутых родов. Предложен набор праймеров (известных и сконструированных *de novo*) для амплификации и секвенирования «housekeeping» генов изученных групп бактерий – для уточнения таксономической принадлежности штаммов, для которых МАЛДИ масс-спектрометрия дает неоднозначные результаты. Выявлены компоненты МАЛДИ масс-спектров – новые хемотаксономические маркеры родов *Clavibacter*, *Rathayibacter* и *Kribbella*.

Таким образом, результаты анализа МАЛДИ масс-спектров, генов 16S рРНК и *gyrB* позволили установить, что изученная коллекция (110 штаммов) корине- и нокардиоформных актинобактерий, обитающих в экосистемах с дефицитом доступной влаги, включает как представителей описанных, так и большое число (более 20) новых видов и подвидов. В числе важных результатов работы – создание инструментария для экспресс-идентификации новых изолятов ряда изученных групп.

Работа поддержана грантом РФФИ № 14-04-31825 мол\_а.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Добровольская Т. Г., Лысак Л. В., Евтушенко Л. И. Микробиология 1993, 5, 904-915.
2. Dridi B., Drancourt M. Methods Microbiol 2011, 38, 283-297.
3. Wang J., Chen W. F., Li Q. X. Analytica chimica acta 2012, 716, 133-137.
4. Присяжная Н. В., Плотникова Е. Г., Буева О. В., Корсакова Е. С., Дорофеева Л. В., Ильина Е. Н., Лебедев А. Т., Евтушенко Л. И. Микробиология 2012, 6, 1-7.
5. Tul'skaya E. M., Streshinskaya G. M., Shashkov A. S., Senchenkova S. N., Avtukh A. N., Baryshnikova L. M., Evtushenko L. I. Carbohydr Res 2011, 346, 2045-2051.

## BIODIVERSITY OF ACTINOBACTERIA ISOLATED FROM DROUGHTY HABITATS

Starodumova I. P.<sup>1,2</sup>, Prisyazhnaya N. V.<sup>1</sup>, Ariskina K. I.<sup>3</sup>,  
Dorofeeva L. V.<sup>1</sup>, Avtukh A. N.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>All-Russian Collection of Microorganisms (VKM), G. K. Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Pushchino; <sup>2</sup>Pushchino State Institute of Natural Sciences, Pushchino; <sup>3</sup>Department of Soil Science, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

A taxonomic study was performed on 110 strains of coryneform and nocardioform actinobacteria isolated from various droughty habitats. Based on the data obtained using the MALDI-TOF mass spectrometry, the analysis of 16S rRNA and *gyrB* genes, and phenotypic characteristics the studied strains were assigned to many known and more than 20 novel species (subspecies) within 12 actinobacterial genera.

---

---

## НОВЫЕ АКТИНОБАКТЕРИИ РОДА *AGREIA* ИЗ РАСТИТЕЛЬНЫХ ГАЛЛОВ, ИНДУЦИРОВАННЫХ ФИТОПАТОГЕННЫМИ НЕМАТОДАМИ

Стародумова И. П.<sup>1,2</sup>, Присяжная Н. В.<sup>1</sup>, Дорофеева Л. В.<sup>1</sup>,  
Евтушенко Л. И.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Всероссийская коллекция микроорганизмов (VKM), Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, Пущино; <sup>2</sup>Пущинский государственный естественно-научный институт, Пущино, Россия

Проведено таксономическое изучение 5 штаммов рода *Agreia*, выделенных из растительных галлов, индуцированных фитопатогенными нематодами сем. *Anguininae* на растениях *Elymus repens* и *Calamagrostis neglecta*. На основе результатов сравнительного анализа генов 16S рРНК и *gyrB*, МАЛДИ масс-спектров и физиолого-биохимических признаков изолятов и типовых штаммов видов *Agreia* (*A. bicolorata* и *A. pratensis*), обнаружены новый вид и подвид в составе рода.

**Ключевые слова:** *Agreia*, фитопатогенные нематоды, *Anguina agropyri*, *Heteroanguina graminophila*, *gyrB*, МАЛДИ масс-спектрометрия.

**Актуальность и цель работы.** Актинобактерии рода *Agreia* (сем. *Microbacteriaceae*) – аэробные, неспорообразующие, неправильные палочки; характеризуются пептидогликаном Б-типа (с диаминамасляной кислотой и орнитинном), менахинонами МК-10 и МК-9 и преобладающими жирными кислотами *изо*-16:0, *анте*изо-15:0 и *анте*изо-17:0 [1]. Два описанных вида *Agreia* (*A. bicolorata* и *A. pratensis*) имеют высокий уровень сходства генов 16S рРНК (99,7%). Представители видов выделены из листовых галлов на вейнике, индуцированных нематодой *Heteroanguina graminophila* (*A. bicolorata*), и из филлосферы травянистых растений (*A. pratensis*).

Многочисленные данные последних лет свидетельствуют, что представители рода *Agreia* являются компонентами микробиомов различных растений и могут составлять до 5–10% от общего числа бактерий, обнаруживаемых в растениях [2, 3]. Предполагается, что подобно другим бактериальным эндофитам, бактерии этого рода могут синтезировать биологически-активные соединения, способствующие росту и развитию растений [2, 3]. Представители *Agreia* обнаружены также в почве, вечной мерзлоте и других природных и антропогенных экосистемах. Вместе с тем, несмотря на широкое распространение в природе бактерий рода *Agreia*, в настоящее время описано только два

вида в составе этого рода. Абсолютное большинство представителей рода, упоминаемых в литературе и базах данных, имеют высокое сходство с типовыми штаммами видов *Agreia* по генам 16S рРНК (> 99%).

Цель настоящей работы – определение видовой принадлежности актинобактерий рода *Agreia*, выделенных из галлов на растениях, с использованием методов анализа генов  $\beta$ -субъединицы ДНК-гиразы (*gyrB*), МАЛДИ масс-спектрометрии и традиционных подходов.

**Материалы и методы исследования.** Объектами исследования были 5 штаммов рода *Agreia*. Четыре штамма (ВКМ Ас-1375, ВКМ Ас-1803, ВКМ Ас-1805 и ВКМ Ас-2052) выделены из того же источника, что и типовой штамм вида *A. bicolorata* – листовых галлов на вейнике (*Calamagrostis neglecta*). ВКМ Ас-1783 изолирован из галлов на стебле пырея (*Elymus repens*). Фенотипические характеристики штаммов изучали, как описано [1]. Для анализа МАЛДИ масс-спектров культуры выращивали на соевом агаре (Difco) и среде «R2А» (Difco) при 28 °С в течение 96 ч. Препараты готовили, как описано ранее [4]. Спектры регистрировали на приборе «Autoflex Speed» (Bruker Daltonics) и анализировали с помощью пакетов программ Flex analysis 3.3 и Biotyper 3.0 (Bruker Daltonics). Гены 16S рРНК амплифицировали с использованием универсальных эубактериальных праймеров 27f и 1525r, фрагменты генов  $\beta$ -субъединицы ДНК-гиразы (*gyrB*) – с использованием праймеров *gyrB*-2F и *gyrB*-4R [5]. Очищенные ПЦР-продукты секвенировали в ЦКП «Геном» (Москва, Россия). Филогенетический анализ проводили с помощью программы MEGA 6.0.

**Результаты и обсуждение.** Изученные культуры имеют высокое сходство с типовыми штаммами известных видов рода *Agreia* по генам 16S рРНК (99,5–99,9%) и характерные для этого рода хемотаксономические признаки [1]. По морфологическим и культуральным свойствам штаммы разделялись на две группы. Одна включала культуры с тонкими клетками (0,4–0,5×1,5–2,5 мкм) и наличием V-форм (все штаммы выделены из галлов на вейнике). Клетки 2-й группы штаммов (*A. pratensis* ВКМ Ас-2510<sup>T</sup> и ВКМ Ас-1783) – утолщенные, более подвижные, быстро распадающиеся на короткие фрагменты.

Анализ МАЛДИ масс-спектров показал, что культуры, выращенные на двух разных средах

(в двух повторностях), имели некоторые отличия в составе спектров, однако группировка штаммов по спектрам оставалась неизменной. Три штамма из листовых галлов на вейнике (ВКМ Ас-1375, ВКМ Ас-1803 и ВКМ Ас-1805) образуют тесный кластер с *A. bicolorata* ВКМ Ас-1804<sup>T</sup> и относятся к *A. bicolorata* (подтверждено методом ДНК-ДНК гибридизации для Ас-1805 и ВКМ Ас-1804<sup>T</sup> [1]). Несколько отстоит от них ВКМ Ас-2052, выделенный из того же источника. Штаммы *Agreia sp.* ВКМ Ас-1783 (из галлов на пырее) и *A. pratensis* ВКМ Ас-2510<sup>T</sup> значительно обособляются от группы *A. bicolorata* и друг от друга.

С целью уточнения видовой принадлежности штаммов были проанализированы нуклеотидные последовательности фрагментов генов *gyrB* (~500 п.н.). Филогенетическая группировка штаммов на основе генов *gyrB* в целом соответствовала группировке по МАЛДИ масс-спектрам. Уровни сходства штамма ВКМ Ас-1783 по генам *gyrB* с типовыми штаммами видов (92,0% с *A. bicolorata* и 93,8% с *A. pratensis*) сопоставимы с показателями сходства между типовыми штаммами видов *Agreia* (92,2%) и филогенетически близкими видами других родов актинобактерий. Кроме того, ВКМ Ас-1783 отличается от *A. bicolorata* и *A. pratensis* по составу сахаров клеточной стенки (наличие галактозы и отсутствие фукозы) и ряду физиолого-биохимических признаков. Высокое сходство ВКМ Ас-2052 с типовым штаммом *A. bicolorata* (97,4%) свидетельствует о его принадлежности к геномовиду *A. bicolorata*. Вместе с тем, штамм ВКМ Ас-2052 не образует красно-оранжевый пигмент (характерный для *A. bicolorata*) и отличается от этого вида отсутствием фукозы в клеточной стенке, а также составом компонентов МАЛДИ масс-спектров и рядом физиолого-биохимических признаков (отрицательный оксидазный тест, отсутствие роста при 6–10% NaCl, устойчивость к рН 11–12, способность утилизировать адонит и др.). Подобные отличия позволяют относить штамм ВКМ Ас-2052 к новому подвиду *A. bicolorata*.

Таким образом, результаты сравнительного изучения новых культур и типовых штаммов известных видов актинобактерий рода *Agreia*, полученные с использованием анализа генов *gyrB*, МАЛДИ масс-спектров, хемотаксономических и физиолого-биохимических признаков свидетельствуют, что штаммы ВКМ Ас-1783 и ВКМ Ас-2052, выделенные из нема-

тодных галлов на пырее и вейнике относятся к новым таксонам видового и подвидового ранга в составе рода *Agreia*.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Evtushenko L. I., Dorofeeva L. V., Dobrovolskaya T. G., Streshinskaya G. M., Subbotin S. A., Tiedje J. M. IJSEM 2001, 51, 2073-2079.
2. Visioli G., D'Egidio S., Vameralli T., Mattarozzi M., Sanangelantoni A. M. Chemosphere 2014, 117, 538-544.
3. Nissinen R. M., Männistö M. K., van Elsas J. D. FEMS Microbiol Ecol 2012, 82, 510-522.
4. Присяжная Н. В., Плотникова Е. Г., Буева О. В., Корсакова Е. С., Дорофеева Л. В., Ильина Е. Н., Лебедев А. Т., Евтушенко Л. И. Микробиология 2012, 6, 1-7.
5. Richert K., Brambilla E., Stackebrandt E. J Microbiol Methods 2005, 60, 115-123.

### NOVEL ACTINOBACTERIA OF THE GENUS *AGREIA* ISOLATED FROM PLANT GALLS INDUCED BY PLANT-PARASITIC NEMATODES

Starodumova I. P.<sup>1,2</sup>, Prisyazhnaya N. V.<sup>1</sup>, Dorofeeva L. V.<sup>1</sup>, Evtushenko L. I.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>All-Russian Collection of Microorganisms (VKM), G. K. Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Pushchino; <sup>2</sup>Pushchino State Institute of Natural Sciences, Pushchino, Russia

A taxonomic study was performed on 5 strains of the genus *Agreia* isolated from plant galls induced by the plant-parasitic nematodes of the family *Anguininae*. The comparative analyses of 16S rRNA and *gyrB* genes, MALDI/TOF mass spectra and phenotypic characteristics of the isolated bacteria and type strains of the known *Agreia* species (*A. bicolorata* and *A. pratensis*) resulted in the detection of a new species and a new subspecies within the genus.

### ГЕН *PSY4* – КЛЮЧЕВОЙ РЕГУЛЯТОР МУТАГЕНЕЗА, ВЫЗВАННОГО ПОВРЕЖДЕНИЯМИ ДНК, У ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Федоров Д. В., Евстюхина Т. А., Черненко А. Ю., Королев В. Г.

ФГБУ «Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова»,  
Гатчина, Россия

Фосфатаза Pph3 вовлечена в процесс дефосфорилирования одной из ключевых чекпойнтных киназ – Rad53 – у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*: белок Pph3 образует комплекс с субъединицей Psy2, который, в свою очередь, связывается с киназой Rad53 и проводит процесс дефосфорилирования последней без привлечения третьей субъединицы. В то же время, тройной комплекс Pph3-Psy2-Psy4 дефосфорилирует гистон  $\gamma$ H2A. Нами показано, что ген *HSM6* является аллелем гена *PSY4* у дрожжей *S. cerevisiae*. Мутация *hsm6-1* повышает уровень спонтанного и УФ-индуцированного мутагенеза. Делеция гена *PPH3* резко увеличивает уровень спонтанного мутагенеза. При больших дозах УФ облучения частоты возникновения мутаций в мутантах *pph3Δ*, *psy4Δ* и *hsm6-1* статистически одинаковы и превышают частоту УФ-индуцированного мутагенеза для штамма дикого типа более чем в 2 раза. В случае репаративного спонтанного мутагенеза нами наблюдался эпистатический эффект мутаций *pph3Δ* и *hsm6-1*. Все исследованные мутантные штаммы показали более чем 10-кратное увеличение уровня индуцированного мутагенеза, индуцированного  $\gamma$ -лучами по сравнению с контрольным штаммом дикого типа. Полученные данные позволяют предположить, что комплекс Pph3-Psy2-Psy4 играет ключевую роль в процессе индуцированного мутагенеза, индуцированного повреждениями структуры ДНК в клетках дрожжей *S. cerevisiae*. Полученные в ходе работы данные, находятся в согласии с ранее полученными свидетельствами о возможной роли генов *PSY4* и *PPH3* в процессе контроля УФ-индуцированного мутагенеза у дрожжей. Данное исследование вносит вклад в понимание фундаментальных механизмов регуляции репарации ДНК и мутагенеза посредством модификаций хроматиновой структуры.

**Ключевые слова:** дрожжи, *Saccharomyces cerevisiae*, мутагенез, регуляция, хроматин, модификаторы.

**Актуальность и цель работы.** В клетках эукариот имеется специализированный механизм ответа на повреждения в структуре ДНК – «чекпойнт», который тормозит и пролонгирует клеточный цикл для эффективного проведения процессов репарации ДНК. Активация чекпойнта происходит за счет фосфорилирования белков, и в клетках дрожжей инициируется двумя основными киназами – Mec1 и Tel1 [2]. Указанные киназы фосфорилируют чекпойнтные белки-медиаторы Rad53 и Rad9, и гистон H2A. Присутствие Mec1p и Rad53p в клетках дрожжей является строго обязательным для активации чекпойнтной киназы Dun1. Основная функция Mec1-Rad53-Dun1-зависимого пути состоит в поддержании определенного уровня дезоксирибонуклеотидтрифосфатов (дНТФ) путем регулирования активности рибонуклеотидредуктазы (РНР), ответственной за синтез всех 4 типов дНТФ, в течение клеточного цикла [2, 3, 5]. В клетках дрожжей РНР контролируется на всех стадиях клеточного цикла, а также инициируется в ответ на повреждение структуры ДНК. Полностью активная РНР способна увеличить концентрацию дНТФ в клетке в 6-8 раз. Увеличение количества дНТФ коррелирует с толерантностью клетки к повреждениям ДНК. Изменения уровня пула дНТФ также соотносятся с повышением или понижением уровня спонтанного мутагенеза.

Наряду с активацией чекпойнта, процесс его терминации важен с точки зрения возобновления корректной репликации ДНК и выживаемости клетки в целом. Необходимым условием для остановки чекпойнта является дефосфорилирование белка Rad53 и гистона  $\gamma$ H2A [3, 5].

Известно, что фосфатаза Rph3 вовлечена в процесс дефосфорилирования ключевой чекпойнтной киназы Rad53 у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* [2, 4]. Белок Rph3 формирует комплекс с субъединицей Psy2, который связывается с киназой Rad53 и дефосфорилирует ее без привлечения третьей субъединицы. Другой комплекс, Rph3–Psy2–Psy4, дефосфорилирует гистон  $\gamma$ H2A. Делетирование любого из трех генов, кодирующих субъединицы тройного комплекса, приводит к повышению чувствительности клеток. Дефосфорилирование белка Rad53 в норме имеет место в клетках мутанта *psy4* $\Delta$  в процессе выхода из чекпойнта. При этом, делеция гена

*PSY4* не оказывает влияния на чувствительность у большинства мутантных штаммов. Инактивация любой из субъединиц тройного комплекса РРНЗ вызывает дефекты при дефосфорилировании гистона  $\gamma$ H2A. Таким образом, возникло предположение, что комплекс Rph3–Psy2 дефосфорилирует Rad53, в то время как комплекс РРНЗ дефосфорилирует гистон  $\gamma$ H2A.

Ранее нами был охарактеризован мутант *hsm6-1* дрожжей *S. cerevisiae*, отличавшийся повышенным уровнем спонтанного мутагенеза [1]. Мутация *hsm6-1* также повышала уровень УФ-индуцированного мутагенеза. Эпистатический анализ показал, что ген *HSM6* является аллелем гена *PSY4*. Точечная мутация *hsm6-1* имеет более резко выраженный фенотип по сравнению с мутацией *psy4* $\Delta$ . Наши эксперименты показали, что ген *PSY4* играет ключевую роль в регуляции выхода клетки из чекпойнта, инициированного повреждением структуры ДНК [1].

**Материалы и методы.** Генотипы штаммов дрожжей *S. cerevisiae*, использованные в ходе работы: дикий тип (ДТ) (*MAT  $\alpha$  ade2 $\Delta$ -248ura3 $\Delta$ -160,188leu2 $\Delta$ -3,112trp1*); *hsm6-1* (*MAT  $\alpha$  ade2 $\Delta$ -248ura3 $\Delta$ -160,188leu2 $\Delta$ -3,112trp1hsm6-1*); *psy4* $\Delta$  (*MAT  $\alpha$  ade2 $\Delta$ -248ura3 $\Delta$ -160,188leu2 $\Delta$ -3,112trp1psy4::NAT*); *pph3* $\Delta$  (*MAT  $\alpha$  ade2 $\Delta$ -248ura3 $\Delta$ -160,188leu2 $\Delta$ -3,112trp1pph3::KanMX*); *hsm6-1 pph3* $\Delta$  (*MAT  $\alpha$  ade2 $\Delta$ -248ura3 $\Delta$ -160,188leu2 $\Delta$ -3,112trp1hsm6-1pph3::KanMX*). Для роста штаммов и учета выживаемости была использована стандартная среда полного состава. Для учета УФ-индуцированного мутагенеза использована среда со спиртом. Учет спонтанного мутагенеза проводился с использованием сред минимального состава с добавлением канаванина.

Чувствительность к летальному действию УФ излучения измерялась с использованием кривых доза-эффект. Чувствительность к мутагенному действию УФ и гамма-лучей регистрировалась при помощи индукции прямых мутаций в 5 *ADE*-локусах, *ADE4*–*ADE8*. Уровни спонтанного мутагенеза измерялись с использованием метода медиан (флуктуационный тест Коулсона-Ли) для учета спонтанных мутаций быстрого репликативного мутагенеза и метода упорядоченного посева («ленинградский тест» Хромова-Борисова) для учета спонтанных мутаций медленного репаративного мутагенеза.



Для разрушения открытой рамки считывания гена *PPH3* клетки штаммов дикого типа и мутанта *hsm6-1* были трансформированы с использованием фрагмента ДНК, созданного при помощи ПЦР, содержащего маркер *KanMX* с фланками, гомологичными фланкам гена *PPH3*. ДНК была выделена из штамма KFY-1073 (*MAT a ura3Δ0leu2Δ0his3Δ1met15Δ0 pph3Δ::KanMX*). Трансформанты отбирались по чувствительности к канаваину при культивировании на полной среде, содержащей канаваин.

**Результаты.** Частоты возникновения спонтанных мутаций устойчивости к канаваину у штамма *pph3Δ hsm6-1*, измеренные при помощи флуктуационного теста, были выше, чем у одиночных мутантов *psy4Δ* и *pph3Δ*, но ниже, чем у штамма *hsm6-1*, причем мутанты *psy4Δ* и *pph3Δ* статистически не отличались от штамма ДТ. Частоты спонтанного мутагенеза, измеренные методом упорядоченного посева, были достоверно выше у всех исследованных штаммов по сравнению со штаммом ДТ: мутация *hsm6-1* повышала уровень спонтанного мутагенеза в ~7 раз, мутация *psy4Δ* – в ~4 раза, а мутации *pph3Δ* и *hsm6 pph3Δ* – в ~16 раз. В эксперименте наблюдался эпистатический характер взаимодействия мутации *pph3Δ* со всеми другими исследованными мутациями.

Нами показано, что мутация *psy4Δ* не оказывает влияния на выживаемость клеток по сравнению со штаммом ДТ. Оба мутантных штамма *hsm6-1* и *pph3Δ* выявили сходную чувствительность к УФ и были более резистентны, чем двойной мутант *pph3Δ hsm6-1*.

Частоты возникновения мутаций в 5 локусах *ADE4–ADE8*, индуцированных УФ, были измерены в штамме дикого типа и мутантах *hsm6-1*, *pph3Δ* и *pph3Δ hsm6-1*. Уровень УФ-индуцированного мутагенеза у мутанта *psy4Δ* статистически не отличается от уровня индуцированного мутагенеза у штамма ДТ. При малых дозах УФ облучения частоты возникновения мутаций в клетках ДТ и мутантах *pph3Δ* и *pph3Δ hsm6-1* сходны и более чем в 3 раза ниже, чем у мутанта *hsm6-1*. При высоких дозах УФ частоты возникновения мутаций во всех исследованных штаммах статистически неразличимы и превышают уровень мутагенеза штамма ДТ более чем в 2 раза. Таким образом, как и в случае спонтанного мутагенеза, мутации *pph3Δ* и *hsm6-1* проявляют эпистатический эффект.

Мы использовали  $\gamma$ -лучи для индукции двуниевых разрывов (ДНР) в ДНК штамма ДТ и мутантов *hsm6-1*, *psy4*, *pph3Δ* и *pph3Δ hsm6-1*. Разница в чувствительности наблюдалась только при низкой дозе  $\gamma$ -облучения. Клетки почкующихся дрожжей проявили схожую резистивность к  $\gamma$ -лучам. В опытах по учету частот возникновения мутаций в 5 локусах *ADE4–ADE8*, индуцированных  $\gamma$ -лучами, все исследованные мутанты (*hsm6-1*, *psy4*, *pph3Δ* и *pph3Δ hsm6-1*) выявили повышенную чувствительность к мутагенному действию  $\gamma$ -лучей по сравнению со штаммом ДТ. Клетки мутантных штаммов в  $G_1$ -фазе показали высокую чувствительность к мутагенному действию  $\gamma$ -лучей в сравнении с клетками почкующихся дрожжей.

**Обсуждение.** Скорость возникновения спонтанных мутаций устойчивости к канаваину, измеренная с помощью флуктуационного теста, у штаммов *psy4Δ* и *pph3Δ* статистически не отличается от таковой у штамма ДТ. В то же время, мутант *hsm6-1* показал более высокую скорость спонтанного мутирования в сравнении с мутантами *psy4Δ* и *pph3Δ*. Введение мутации *pph3Δ* частично супрессирует спонтанный мутагенез у штамма *hsm6-1*. Эти данные позволяют утверждать, что белок Psy4 может действовать независимо от Pph3p. Мутация *hsm6-1* относится к мутациям по типу «сдвиг рамки считывания», в результате которой получается укороченный белок с сохранением N-концевого домена. Укороченная форма белка способна сформировать тройной комплекс с Pph3 и Psy2, но последний не в состоянии реализовать свои энзиматические функции.

Мутант *pph3Δ* проявляет экстремально высокий уровень спонтанного репаративного мутагенеза аналогично двойному мутанту *pph3Δ hsm6-1*. Таким образом, можно говорить об эпистатическом характере взаимодействия мутаций *pph3Δ* и *hsm6-1*. Мутации *pph3Δ*, *psy4Δ* и *hsm6-1* стимулируют склонный к ошибкам путь репарации ДНК.

В необлученных клетках чекпойнт индуцируется, когда остановленные перед разрывами ДНК репликативные комплексы инициируют образование брешей [3, 5]. В ответ на образование однонитевой ДНК активируется Mec1, а затем Rad53 киназа. Активация Rad53 является кратковременной вследствие малого количества спонтанных разрывов ДНК в клетках

дикого типа и мутантах *pph3Δ* и *psy4Δ*, и не оказывает существенного влияния на увеличение уровня спонтанного репликативного мутагенеза. Деактивация Rad53 в мутанте *hsm6-1* является пролонгированной в сравнении с мутантом *psy4Δ*; результатом этого является повышение уровня спонтанного мутагенеза. Резко повышенный уровень спонтанного мутирования в клетках мутанта *pph3* наблюдается в случае упорядоченного посева, когда число спонтанных разрывов ДНК существенно выше, чем в случае флуктуационного теста.

Чекпойнтный белок Rad9 способен связываться с гистоном  $\gamma$ H2A [2, 3], в результате чего происходит активация Rad9p, который, в свою очередь, связывается с неактивным белком Rad53. За этим следует стадия Mec1-зависимого фосфорилирования Rad53 и автофосфорилирования Rad53. Для активации Rad9 и Rad53 строго необходимым является присутствие гистона  $\gamma$ H2A в структуре хроматина. После завершения процесса репарации ДНК гистон  $\gamma$ H2A полностью удаляется из хроматина, что приводит к терминации активации Rad9 и Rad53 [3, 5].

Белок Pph3 является каталитической субъединицей РРНЗ фосфатазного комплекса, биохимической функцией которого является дефосфорилирование гистона  $\gamma$ H2A. Фосфатаза РРНЗ формирует стабильный комплекс с гистоном  $\gamma$ H2A; процесс дефосфорилирования гистона является сильно протяженным во времени. Элиминирование гистона  $\gamma$ H2A из структуры хроматина происходит независимо от работы тройного комплекса. Другой комплекс, состоящий только из двух субъединиц (Pph3 и Psy2) дефосфорилирует белок Rad53. Баланс между двумя указанными комплексами регулируется внутриклеточными факторами [2–5]. У дрожжей *S. cerevisiae* была обнаружена фосфатаза Glc7, также ответственная за дефосфорилирование гистона  $\gamma$ H2A [3]. Когда оба фермента представлены в клетке, количество свободных гистонов  $\gamma$ H2A будет снижено, что провоцирует распад комплекса РРНЗ- $\gamma$ H2A. Это смещает равновесие между комплексами РРНЗ и Pph3-Psy2 в сторону последнего. Свободный комплекс Pph3-Psy2 дефосфорилирует активный Rad53, который, в свою очередь, инициирует выход клетки из чекпойнта [5].

После облучения клеток УФ в процессе репликации образуются одноконцевые ДНР

ДНК. В мутантах *psy4Δ* и *pph3Δ* значительное увеличение уровня мутагенеза наблюдалось только при высоких дозах УФ облучения, т.е. именно в этом случае, имелось достаточное количество ДНР ДНК, что приводило к переходу клетки в состояние чекпойнта. Увеличивается также количество свободных гистонов  $\gamma$ H2A, что отражается на уровне индуцированного мутагенеза.

Механизм репарации двуконцевого ДНР отличается от механизма репарации одноконцевого ДНР ДНК: гистоны H2A фосфорилируются на большем протяжении от обоих концов ДНР, что приводит к образованию множественных фосфорилированных гистонов  $\gamma$ H2A. Дальнейшее увеличение количества ДНР ДНК приводит к росту уровня индуцированного мутагенеза. Для подтверждения данного предположения мы использовали  $\gamma$ -лучи как источник множественных двуниевых разрывов в ДНК.

Частоты возникновения мутаций, индуцированных  $\gamma$ -лучами, были сверхвысокими для всех изученных мутантов в сравнении со штаммом ДТ. Максимальный уровень индуцированного мутагенеза наблюдался в G<sub>1</sub>-фазе роста мутантных клеток. В почкующихся дрожжах деградация 5'-концов ДНК происходит за достаточно короткий срок в результате быстрого обмена участкам цепей ДНК между сестринскими хроматидами. Вследствие этого, накопление  $\gamma$ H2A также будет скоротечным, а активация Rad53p – минимальной. Напротив, в G<sub>1</sub>-фазе деградация 5'-концов ДНК будет более протяженной во времени вследствие невозможности правильной рекомбинации между хроматидами, что приведет к увеличению концентрации гистонов  $\gamma$ H2A.

Ранее мы предполагали, что чувствительность мутанта *hsm6-1* к летальному действию УФ лучей и повышенный уровень спонтанного и индуцированного мутагенеза обусловлены задержкой выхода клеток из чекпойнта [1]. В настоящей работе нами получено подтверждение высказанному предположению. Мутация *pph3Δ* инактивирует тройной фосфатазный комплекс, интенсивность дефосфорилирования Rad53p сильно снижается, что влечет увеличение уровней спонтанного и УФ-индуцированного мутагенеза. То есть, замедление фосфорилирования Rad53p можно считать основной причиной повышения уровня индуцированного мутагенеза.

Таким образом, функция тройного комплекса РРНЗ может состоять в контроле скорости выхода поврежденных клеток из чекпойнта и активации механизма пострепликативной репарации ДНК. РРНЗ (аналогично Glc7) связывается с *de novo* синтезированными гистонами  $\gamma$ H2A, транспортируемыми в нуклеоплазму, и проводит их дефосфорилирование. По окончании процесса репарации ДНК количество свободных гистонов  $\gamma$ H2A снизится, и несвязанный с  $\gamma$ H2A комплекс РРНЗ подвергнется диссоциации с образованием двухсубъединичного комплекса Pph3-Psy2, который инициирует дефосфорилирование Rad53p. Промежуточно дефосфорилированный Rad53p способен активировать синтез дНТФ, что является сигналом к началу процесса пострепликативной репарации ДНК, сопровождающейся резким повышением уровня репаративного мутагенеза. В случае, когда в составе комплекса РРНЗ находится дефектная субъединица, кодируемая аллелем *HSM6*, диссоциация тройного комплекса замедлена, что приводит к пролонгации существования

фосфорилированной формы Rad53p, являющейся сигналом активации пострепликативной репарации ДНК. Последующее дефосфорилирование Rad53p приводит к деактивации чекпойнта, выключению РНР и завершению пострепликативной репарации.

Таким образом, полученные нами результаты позволяют говорить о гене *PSY4* как о ключевом регуляторе мутагенеза, вызванного повреждениями ДНК, у дрожжей *S. cerevisiae*.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Fedorov D. V., Kovaltsova S.V., Evstuhina T.A., Peshekhonov V.T., Chernenkov A. Yu et al. *Russ J Genet* 2013, 49 (3), 286-293.
2. Javaheri A., Wysocki R., Jobin-Robitaille O., Altaf M., Cote J. et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006, 103, 13771-13776.
3. Keogh M. C., Kim J. A., Downey M., Fillingham J., Chowdhury D. et al. *Nature* 2006, 439, 497-501.
4. Kumar D., Viberg J., Nilsson A. K., Chabes A. *Nucl Acids Res* 2010, 38, 3975-3983.
5. O'Neill B.M., Szyjka S.J., Lis E.T., Bailey A.O., Yates J.R. 3rd et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007, 104, 9290-9295.

### ***PSY4* GENE IS A KEY REGULATOR OF DNA DAMAGE INDUCED MUTAGENESIS IN YEAST *SACCHAROMYCES CEREVISIAE***

**Fedorov D. V., Evstyukhina T. A., Chernenkov A. Yu., Korolev V. G.**

*Petersburg Nuclear Physics Institute, Gatchina, Russia*

Pph3 phosphatase is involved in the dephosphorylation of the crucial checkpoint kinase Rad53 in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Pph3 protein forms a complex with a Psy2 subunit, which binds to Rad53 kinase and dephosphorylates it without the involvement of a third subunit. Triple complex consisting of Pph3, Psy2 and Psy4 subunits dephosphorylates  $\gamma$ H2A. Earlier, we have shown that the *HSM6* gene represents an allele of *PSY4* gene. The *hsm6-1* mutation increased the frequency of DNA repair spontaneous and UV-induced mutagenesis. In this study, we show that the deletion of *PPH3* gene increases the rate of spontaneous mutagenesis by a factor of seven in *S. cerevisiae*. At high UV light doses the frequencies of mutations in *pph3Δ*, *psy4Δ* and *hsm6-1* mutant strains are equal and exceed the level of mutagenesis in the wild type strain approximately twofold. In case of reparative spontaneous mutagenesis, *pph3Δ* and *hsm6-1* mutations show epistatic effect. All mutants exhibited higher (approximately 10-fold) frequency of  $\gamma$ -induced mutations in comparison with the wild type strain. Pph3-Psy2-Psy4 protein complex is supposed to be a key regulator of DNA damage induced mutagenesis in yeast *S. cerevisiae*. To our knowledge, this is a first report of *PSY4* and *PPH3* genes to be the crucial regulators of gamma rays induced mutagenesis in yeast *S. cerevisiae*. These results are in accordance with previously obtained evidence of gene *PSY4* to control the UV-induced mutagenesis. This research makes clear the fundamental process of DNA repair and mutagenesis regulation through chromatin modifications.

## МОЛЕКУЛЯРНАЯ *IN SITU* ДЕТЕКЦИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ В ФИЛЬТРАЦИОННЫХ ВОДАХ ПОЛИГОНА ЗАХОРОНЕНИЯ ТВЁРДЫХ БЫТОВЫХ ОТХОДОВ

Шаравин Д. Ю.<sup>1</sup>, Беляева П. Г.<sup>1</sup>, Саралов А. И.<sup>1</sup>,  
Кузнецов Б. Б.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь;

<sup>2</sup>Центр «Биоинженерия» РАН, Москва, Россия

Было исследовано микробное сообщество обводного канала городского полигона твёрдых бытовых отходов «Софроны», Пермь, Россия. Наиболее многочисленными были представители домена Bacteria, составившие до 65% от общего числа клеток. Филум *Proteobacteria* среди Bacteria составил 83%. В «тепловодной» пробе доминировали термофильные клоны трёх кластеров филума *Euryarchaeota* домена Archaea и группа клонов термофильных бактерий филума *Thermotogae*. По мере охлаждения сточных вод полигона снижалось содержание *Delta*- и *Gamma*proteobacteria, но увеличивалась доля *Alphaproteobacteria*.

**Ключевые слова:** сточные воды, микроорганизмы, молекулярная *in situ* детекция.

**Актуальность и цель работы.** Известно, что большая часть городских твёрдых бытовых отходов складывается на специализированных полигонах захоронения твёрдых бытовых отходов (ПТБО). Температура тела полигона может варьировать от 30 °С до 60 °С вследствие разложения разнообразного органического субстрата. Процессы анаэробного разложения биополимеров высвобождают множество простых соединений, а также биогаз, состоящий преимущественно из CH<sub>4</sub> и CO<sub>2</sub>. При этом вклад полигонов в глобальную эмиссию метана оценивается в 6–12%. Однако микробная экология и функционирование подобных объектов остаются плохо изученными [1].

**Целью** настоящего исследования являлась молекулярная *in situ* идентификация микроорганизмов с использованием метода FISH и анализ библиотеки клонов генов 16S рРНК и *mxaF* фильтрационных вод ПТБО.

**Материалы и методы.** Были исследованы старая «холодноводная» секция ирригационного канала в южной части ПТБО и молодая «тепловодная» секция в северной части ПТБО, где в середине марта при температуре окружающей среды –13 °С температура у дна превышала 23 °С. ДНК из проб сточных вод экстрагировали, используя Soil DNA Extraction kit

(MoBio, Laboratories, USA). При проведении ПЦР использовали праймеры: f1003 и r1561 (для *mxaF*), 27f и 1492r (16S рРНК Bacteria), A8F, A800R, A1041R (16S рРНК Archaea) [2–4]. Очищенные ПЦР-фрагменты были клонированы в векторную систему pGEM-T (Promega, USA) в клетки *Escherichia coli* DH5α. Общее количество клеток бактериопланктона определяли методом эпифлуоресцентной микроскопии с окрашиванием их ДНК-специфичным красителем ДАФИ (4'-диамино-2-фенилиндолом). В методе FISH использовали групп-специфичные зонды ARC 344 (Archaea), EUB 338 (Bacteria), HGC69a (Actinobacteria), SRB385Db (Deltaproteobacteria), ALF1b (Alphaproteobacteria), BET42a (Betaproteobacteria), Gam42a (Gammaproteobacteria) и CFB560 (Bacteroidetes) [5]. Нуклеотидные последовательности депонированы в GenBank под номерами KM870230–KM870503.

**Результаты.** Слабощелочные фильтрационные воды молодой «тепловодной» секции полигона характеризовались высоким уровнем загрязнения по аммонии, нитратам, нитритам, фосфору, железу, хрому, никелю и метану. В старой «холодноводной» секции наблюдалось резкое снижение цветности раствора, концентрации метана, азота, общего фосфора, хрома,

железа и натрия. Общее количество клеток, определённое по ДАФИ, в обеих пробах было приблизительно одинаково ( $98 \times 10^6$  кл/мл). Доминировали представители Bacteria. *Proteobacteria* были представлены в количестве более 50% для обеих проб по ДАФИ или более 83% от Bacteria (*Gammaproteobacteria* 58,5% в «тёплой» пробе и 32,2% в «холодной», *Delta-proteobacteria* 8,2% и 3,3%, *Alphaproteobacteria* 6,8% и 21,4%, *Betaproteobacteria* 10,0% и 27,3% от Bacteria). Количество представителей домена Archaea достигало 6,3% от ДАФИ в «тёплой» пробе, но снижалось до 0,6% в «холодной». Минорный компонент был представлен филумами *Actinobacteria* и *Bacterioidetes* (2–4% от Bacteria).

Согласно филогенетическому анализу архейных клонов гена 16S рРНК, в «тёплой» пробе один клон был связан с новым филумом *Thaumarchaeota*, четыре – с недавно описанным видом *Crenarchaeota*, *Ignisphaera aggregans*, 36 клонов с метаногенными археями филума *Euryarchaeota*. Клоны метаногенов формировали три гетерогенных кластера: 28 клонов “*Candidatus Methanomethylophilus alvus*”, 4 клона “*Candidatus Methanomassiliicoccus intestinalis*” и 4 клона *Methanomicrococcus blatticola*. По сравнению с имеющимися данными об аналогичных антропогенных местообитаниях нами обнаружено большее разнообразие Archaea.

Из 135 эубактериальных клонов 103 клон были связаны с *Proteobacteria*, 59 клонов с *Gammaproteobacteria* и 32 клон с *Betaproteobacteria*. Группа клонов *Pseudomonas caeni* HY-14 в «тёплой» пробе формировала гетерогенный кластер с клонами нитрат-редуцирующего гетеротрофа *Idiomarina taiwanensis* PIT1 и аэробного гетеротрофа *Pseudomonasmaricurvus alkylphenoliticus* KU41G. Также, в данной пробе 12 клонов формировали гомогенный кластер бетапротеебактерией *Advenella kashmirensis* WT001.

Значительное количество клонов представляли высокоомогенную филогенетическую группу, связанную с *Defluviitoga tunisiensis* DSM 203805, принадлежащую филуму Thermotogae. Как «тёплая», так и «холодная» пробы содержали по 2–4 клон представителей *Delta-* и *Ep-*

*silonproteobacteria*. Группа клонов, связанных с *Bacterioidaceae*, *Clostridia*, гаммапротеебактерией *Thiomicrospira* sp. NP20, и альфапротеебактерией *Roseovarius* sp. SS16.20 16S, обнаружена только в пробе «холодных» сточных вод.

Ген, кодирующий метанолдегидрогеназу, ключевой фермент пути ассимиляции метанола, был обнаружен во всех исследованных образцах. Филогенетический анализ полученных сиквенсов показал, что клоны формировали три основных группы. Из пробы «тёплых» вод 29 клонов *mxaF*-гена принадлежали гаммапротеебактериальному метанотрофу *Methylobacter luteus*, 2 клон – альфапротеебактериальным метанотрофам *Methylosinus trichosporium/Methylocystis parvus*. Из пробы «холодных» фильтрационных вод 30 клонов были близки с бетапротеебактериальным метилотрофом *Advenella kashmirensis* W13003. Согласно полученным данным представители *Gammaproteobacteria* доминируют во всех пробах, однако, в «холодной» пробе ни одного *mxaF* клон гаммапротеебактерий обнаружено не было. Напротив, здесь доминировали представители *Betaproteobacteria*.

Таким образом, обнаруженное филогенетическое разнообразие Bacteria (в частности метано- и метилотрофных *Proteobacteria*) и Archaea в «тёплой» и «холодной» пробах фильтрационных вод показывает уникальность данной экосистемы не имеющей аналогов в природе.

Работа поддержана Программой УрО РАН «Молекулярная и клеточная биология» (№ 01201256858).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Вайсман Я. И., Вайсман О. Я., Максимов С. В. Управление метаногенезом на полигонах твердых бытовых отходов. ПИТУ, Пермь 2003.
2. McDonald I.R., Murrell J C Appl Environ Microbiol 1997, 63, 3218-3224.
3. Lane D.J. 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt E, Goodfellow M, (eds.) Nucleic acid techniques in bacterial systematics. Chichester, UK 1991, 115-167.
4. Kolganova T.V., Kuznetsov B.V., Turova T.P. Microbiology 2002, 71, 243-246.
5. Панкратов Т. А., Белова С. Э., Дедыш С. Н. Микробиология 2005, 74, 831-837.

## MOLECULAR *IN SITU* DETECTION OF MICROORGANISMS IN LANDFILL LEACHATE

Sharavin D. Y.<sup>1</sup>, Belyaeva P. G.<sup>1</sup>, Saralov A. I.<sup>1</sup>, Kuznetsov B. B.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, RAS, Perm;*

<sup>2</sup>*Bioengineering Center, RAS, Moscow, Russia*

Microbial community of municipal landfill irrigation canal was investigated by means of FISH method, *mxhF* and 16S rRNA gene library analysis. Most abundant representatives of domain Bacteria comprised up to 65% of the total cell number as estimated by DAPI staining and of phylum *Proteobacteria* – 83% of the number of Bacteria detected by FISH. In “warmwater” sample predominant clones of three different clusters of anaerobic methylotrophic methanogens of domain Archaea and highly homogenous phylogenetic group of clones within phylum *Thermotogae* were identified. The proportion lowering was registered in *Delta*- and *Gamma*proteobacteria, especially methanotrophs. Meanwhile, the fraction of *Alphaproteobacteria* was elevated.

## ГЕННЫЕ СЛИЯНИЯ КАК ИНСТРУМЕНТ РЕШЕНИЯ ФУНДАМЕНТАЛЬНЫХ И ПРИКЛАДНЫХ ЗАДАЧ

Шумков М. С.<sup>1</sup>, Шумкова Е. С.<sup>1</sup>, Плотникова Е. Г.<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>*Институт биохимии им. А. Н. Баха РАН, Москва;* <sup>2</sup>*Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь;* <sup>3</sup>*Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь, Россия*

Данный обзор имеет целью коротко обобщить некоторые достижения в области создания и использования генных слияний. Рассматриваются вопросы измерения генной экспрессии, выделения рекомбинантных белков, конструирования гибридных ферментов и создания цельноклеточных биосенсоров.

*Ключевые слова:* генные слияния, химерные белки, биосенсоры.

Развитие современной микробиологии, особенно физиологии микроорганизмов, немислимо без использования широкого спектра молекулярно-биологических методов. Полимеразная цепная реакция, рестрикционные эндонуклеазы и лигазы давно уже стали незаменимыми помощниками исследователя при изучении роли тех или иных клеточных компонентов. Их применение обеспечивает возможность конструирования сверхэкспрессионных векторов, получения делеционных мутантов, выделения рекомбинантных белков, оценки эффективности *in vivo* взаимодействий и многое другое [1].

Особое место среди инструментов решения фундаментальных и прикладных задач занимают генные слияния. Они представляют собой полинуклеотидные цепи, искусственно

составленные из фрагментов природных генов и/или специально синтезированных кодирующих последовательностей.

Остановившись лишь на некоторых вариантах генных слияний, можно выделить конструкции используемые (1) для выделения экспрессируемых белков, (2) для создания химерных ферментов и регуляторных молекул и (3) репортерные слияния, позволяющие количественно измерять уровень экспрессии исследуемого гена.

В первом случае, мы обычно имеем дело с векторами, в которых клонируемые гены объединяются с последовательностями, кодирующими полипептидные цепочки со свойствами специфических лигандов. Наиболее известна в этом отношении последовательность, обеспечивающая введение в состав

гибридного белка полигистидинового «хвоста», существенно облегчающего очистку рекомбинантного белка методами аффинной хроматографии. Помимо этого, в состав экспрессируемого белка таким же образом могут быть введены последовательности, обеспечивающие адресную доставку синтезируемой молекулы, её экспонирование на поверхности бактериальной клетки и даже последующее удаление «неродных» полипептидных доменов с целью получения выделенного белка в немодифицированном виде.

Генные слияния, обеспечивающие синтез химерных молекул, составленных из частей полноразмерных природных белков, используются, например, для изучения свойств регуляторов белкового синтеза. Так, варианты фактора терминации трансляции человека с введёнными в его состав участками аналогичного белка архей позволили детально проследить процесс распознавания стоп-кодонов у организмов с вариантным генетическим кодом [2]. С другой стороны, объединение в одной бифункциональной молекуле  $\beta$ -галактозидазы и галактозодегидрогеназы привело к созданию гибридного фермента и обеспечило возможность более эффективного протекания сопряженных ферментативных реакций в биотехнологии [3].

Репортерные генные слияния отличаются тем, что в итоговой гибридной молекуле одна из частей выступает в качестве репортера, то есть может «сообщать» исследователю информацию о содержании белка в клетке и за её пределами, о скорости его биосинтеза и деградации, о местонахождении целевого полипептида в той или иной фракции клеточного лизата и т.д. Такое свойство позволяет широко использовать подобные конструкции для изучения экспрессии генов, поиска промоторных областей оперонов, выделения и очистки рекомбинантных белков, исследования взаимодействия молекул *in vivo* и создания цельноклеточных биосенсоров.

В качестве репортера нередко используется уже упоминавшаяся  $\beta$ -галактозидаза. Её активность может быть легко детектирована с использованием хромогенных субстратов, например, о-нитрофенил- $\beta$ -D-галактопиранозид. Названное соединение бесцветно, но расщепление его по  $\beta$ -галактозидной связи приводит к образованию жёлтого о-нитрофенола, концентрация которого в реакционной смеси,

пропорциональная уровню экспрессии исследуемого гена, может быть легко определена спектрофотометрически. Несмотря на высокую чувствительность этого метода, позволяющего уверенно детектировать транскрипцию гена даже при синтезе всего лишь одной копии его мРНК за генерацию [4], он не может быть использован для «прижизненной» детекции генной экспрессии. Для решения таких задач обычно применяют слияния с генами флуоресцентных белков, подобных зелёному флуоресцентному белку (GFP).

GFP и GFP-подобные молекулы, в реальном времени излучающие кванты света при облучении электромагнитными волнами определённой длины, позволяют не только исследовать уровень генной экспрессии или выявить локализацию изучаемого белка, но и проследить его перемещения в живых клетках и тканях и даже обнаружить белок-белковые взаимодействия. Одним из ограничений использования флуоресцентных белков является наличие в клетках других способных к флуоресценции молекул, однако оно преодолевается подбором репортера с неперекрывающимся диапазоном излучения.

Особой сферой использования репортерных генных слияний является создание бактериальных биосенсоров, которые основываются на естественных механизмах активации генной экспрессии в ответ на определённое внешнее воздействие. Если рН или температуру легче измерить физическими методами, то, например, концентрацию в почвенной вытяжке стойких загрязнителей окружающей среды полихлорированных бифенилов определить аналитически весьма сложно, особенно, если это необходимо сделать в «полевых» условиях. В этом случае можно сконструировать слияние гена GFP с частью гена, транскрипция (и трансляция) которого возрастают в ответ на поступление в клетку детектируемых соединений, а затем просто измерить интенсивность свечения с использованием портативного флуориметра или флуоресцентного микроскопа.

Таким образом, использование генных слияний позволяет исследователю решить широкий спектр разнообразных фундаментальных и прикладных задач. Разработаны методы определения сложных химических соединений, созданы конструкции для выявления возбудителей различных заболеваний и т.д.

Возможно, завтра человек найдёт для генных слияний новые интересные и полезные применения...

Работа выполнена в рамках ФЦП Министерства образования и науки Российской Федерации «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 годы», соглашение № 14.574.21.0028, шифр 2014-14-576-0058-20.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Патрушев Л. И. Искусственные генетические системы. Наука, Москва 2004.
2. Елисеев Б. Д. Автореферат диссертации на соискание степени кандидата биологических наук. Москва 2011.
3. Ljungcrantz P., Carlsson H., Mansson M. — O. et al. *Biochemistry* 1989, 28, 8786-8792.
4. Simons R. W., Houman F., Kleckner N. *Gene* 1987, 53, 85-96.

## APPLICATIONS OF GENE FUSIONS FOR RESOLVING OF FUNDAMENTAL AND APPLIED TASKS

Shumkov M. S.<sup>1</sup>, Shumkova E. S.<sup>1</sup>, Plotnikova E. G.<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>A. N. Bach Institute of Biochemistry RAS, Moscow; <sup>2</sup>Perm State National Research University, Perm;

<sup>3</sup>Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms UB RAS, Perm, Russia

The proposed review aims to give a short introduction into construction and different ways of usage of gene fusions. The gene expression measurement, recombinant proteins purification, hybrid enzymes creation and living-cell biosensors construction are under consideration.

## ОСОБЕННОСТИ ОРГАНИЗАЦИИ ГЕНОВ ДЕСТРУКЦИИ БИФЕНИЛА/ПОЛИХЛОРИРОВАННЫХ БИФЕНИЛОВ *RHODOCOCCLUS RUBER* P25

Шумкова Е. С.<sup>1,2</sup>, Ульссон Б. Э.<sup>2,3</sup>, Плотникова Е. Г.<sup>2,4</sup>

<sup>1</sup>Институт биохимии имени А. Н. Баха, РАН, Москва; <sup>2</sup>Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь; <sup>3</sup>Государственный университет Сковде, Сковде, Швеция; <sup>4</sup>Институт экологии и генетики микроорганизмов, УрО РАН, Пермь, Россия

*Rhodococcus ruber* P25 представляет интерес как активный деструктор бифенила/полихлорбифенилов – чрезвычайно устойчивых и опасных загрязнителей природной среды. С использованием платформы GS Junor (Roche) проведено секвенирование генома штамма P25. В результате анализа контигов выявлен кластер генов деструкции бифенила, организация которого отличается от известных к настоящему времени *bph*-оперонов.

**Ключевые слова:** *Rhodococcus ruber*, полихлорированные бифенилы, *bph*-оперон, бифенил 2,3-диоксигеназа.

**Актуальность и цель работы.** *Rhodococcus ruber* P25 представляет интерес как активный деструктор полихлорбифенилов (ПХБ) – чрезвычайно устойчивых и опасных загрязнителей природной среды [1].

Разложение бифенила/ПХБ у бактерий проходит по общему, «верхнему пути» биодеградации бифенила, в процессе которого

бифенил расщепляется до пентадиеновой и (хлор) бензойной кислоты в результате четырех последовательных ферментативных реакций с участием мультикомпонентной бифенил 2,3-диоксигеназы (БДО), включающей три  $\alpha$ -, три  $\beta$ -субъединицы, ферредоксин и ферредоксин редуктазу; бифенил-2,3-дигидродиол 2,3-дегидрогеназы, 2,3-дигидроксибифенил



1,2-диоксигеназы и 2-гидрокси-6-оксо-6-фенилгекса-2,4-диеноат (ГОФДК) гидролазы. БДО – ключевой фермент, специфичность которого определяет спектр конвертируемых бактериями конгенеров ПХБ [2].

Ранее с использованием ДНК *R. ruber* P25 были получены нуклеотидные последовательности гена  $\alpha$ -субъединицы БДО (*bphA1*) соответствующие активному центру (АЦ) и кластеру Риске (КР) (GenBank no. KP985699). Дедуктивные аминокислотные последовательности оказались на 99 и 100% (соответственно АЦ и КР) сходны с геном  $\alpha$ -субъединицы фенилпропионат диоксигеназы бактерий рода *Rhodococcus* (WP\_010592303.1) и на 97 и 99% (соответственно АЦ и КР) – *nah/bph*-генами диоксигеназы *Rhodococcus* sp. EsD8 (WP\_006933068.1). Полную нуклеотидную последовательность гена *bphA1* получить не удалось [3].

У большинства бактерий гены, отвечающие за деградацию бифенила и ПХБ, организованы в кластеры. Известно несколько типов кластеров *bph*-генов [2]. Данных о структуре *bph*-оперона *R. ruber* в литературе нет.

**Цель работы** – выявить гены деструкции бифенила в контигах, полученных в результате геномного секвенирования *R. ruber* P25.

**Материалы и методы.** Объект исследования – штамм *R. ruber* P25 (=ИЭГМ896), выделенный из почвы, загрязненной галогенированными ароматическими соединениями [1]. Выделение тотальной ДНК проводили по общепринятому методу [4]. Секвенирование генома и сборку контигов осуществляли на платформе GS Junior (Roche). Поиск открытых рамок трансляции (ORF) осуществляли с использованием программ GeneMark и GLIMMER. Трансляцию нуклеотидных последовательностей проводили в UniproUGENE. Поиск гомологичных последовательностей проводили по базам данных GenBank/DBJ/EMBL (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) с использованием алгоритма BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

**Результаты.** Проведено секвенирование генома активного деструктора бифенила/ПХБ *R. ruber* P25. Суммарная длина контигов составила 5728255 п.н., что сопоставимо с размером генома *R. pyridinivorans* SB3094 (NC\_023150.1), наиболее близкого по гену 16S рРНК виду *R. ruber*, для которого известен полный геном.

В результате анализа контигов выявлен кластер генов «верхнего пути» деструкции бифенила/ПХБ. Организация *bph*-оперона

у штамма P25 отличается от таковой у известных бактерий-деструкторов бифенила/ПХБ: *bphRorf2orf1A4DCA1A2A3* Транскрипция *orf1* и *orf2* идет в направлении, противоположном *bphR* и *bphA4DCA1A2A3B*. Предполагается, что выявленные гены кодируют следующие белки: *bphR* (723 п.н.) – регулятор транскрипции семейства IclR; *orf2* (234 п.н.) – гипотетический белок, содержащий тетратрикопептид-повторы (TPR); *orf1* (1644 п.н.) – гипотетический белок с неизвестной функцией; *bphA4* (1257 п.н.) – ферредоксин редуктаза; *bphC* (870 п.н.) – 2,3-дигидроксибифенил 1,2-диоксигеназа; *bphD* (846 п.н.) – ГОФДК-гидролаза; *bphA1* (1332 п.н.) –  $\alpha$ -субъединицу БДО; *bphA2* (561 п.н.) –  $\beta$ -субъединицу БДО; *bphA3* (390 п.н.) – ферредоксин; *bphB* (768 п.н.) – бифенил 2,3-дигидродиол дегидрогеназа. После *bphB* расположены гены, кодирующие ферменты «нижнего пути» деструкции бифенила – *bphFGEorf0*, участвующие в конверсии 2-гидрокси-пента-2,4-диеновой кислоты до ацетилCoA: 4-гидрокси-2-оксвалерат альдолаза, ацетальдегид дегидрогеназа, 2-кето-4-пентеноат гидратаза, соответственно; *orf0* кодирует белок-регулятор транскрипции. Транскрипция генов *bphFGE* идет в направлении, противоположном генам «верхнего пути» деструкции бифенила. Проведен BLAST-анализ транслированных нуклеотидных последовательностей генов *bph*-оперона. Выявлен следующий уровень сходства аминокислотных последовательностей с гомологичными белками (%): *VphR* – регулятор транскрипции семейства IclR, *R. ruber* (WP\_040275720.1) – 99; *Orf1*, *Orf2* – не найдено значимого сходства; *VphA4* – пиридин нуклеотид-дисульфид оксидоредуктаза *R. ruber* (WP\_040275731.1) – 99, *Rhodococcus* sp. P14 (WP\_010592306.1) – 99, ферредоксин редуктаза *Rhodococcus* sp. EsD8 (WP\_006933073.1) – 89; *VphD* – ГОФДК-гидролаза *R. ruber* (WP\_040275733.1) – 100, *Rhodococcus* sp. P14 (WP\_010592305.1) – 99, *Rhodococcus* sp. EsD8 (WP\_044475720.1) – 95; *VphC* – 2,3-дигидроксибифенил 1,2-диоксигеназа *R. ruber* (CDZ92501.1) – 99, *Rhodococcus* sp. EsD8 (CCW10449.1) – 94; *VphA1*-3-фенилпропионат диоксигеназа *Rhodococcus* sp. (WP\_010592303.1) – 100,  $\alpha$ -субъединица *nah/bph*-подобной диоксигеназы *Rhodococcus* sp. EsD8 (WP\_006933068.1) – 97; *VphA2* –  $\beta$ -субъединица бензол 1,2-диоксигеназы *Rhodococcus* sp. (WP\_010592302.1) – 100, *R. ruber* (WP\_017680463.1) – 98,  $\beta$ -субъединица БДО

*Rhodococcus* sp. EsD8 (WP\_006933066.1) – 94; BphA3 – (2Fe-2S)-содержащий белок *R. ruber* (WP\_026137690.1) – 100, ферредоксин 3-фенилпропионат диоксигеназа *Rhodococcus* sp. EsD8 (WP\_006933065.1) – 94; BphB – 2,3-дигидрокси-2,3-дигидрофенилпропионат дегидрогеназа *R. ruber* (WP\_040275749) – 100.

Таким образом, вероятно, что выявленный оперон участвует в деструкции бифенила/ПХБ. Структура *bph*-оперона *R. ruber* P25 отличается от известных к настоящему времени оперонов деструкции бифенила/ПХБ.

Работа поддержана грантом РФФИ № 13-04-96049 р\_урал\_а. Геномное секвени-

рование выполнено в ЦКП «Геном» при ИМБ РАН (Москва).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Плотникова Е. Г., Рыбкина Д. О., Демаков В. А. Штамм бактерий *Rhodococcus ruber* – деструктор полихлорированных бифенилов. Патент РФ № 2262531. Опубликовано 20.10.2005 г. Бюл. № 29.
2. Шумкова Е. С., Егорова Д. О., Боронникова С. В., Плотникова Е. Г. Молекулярная биология 2015, 4, в печати.
3. Pieper D. H., Seeger M. J Mol Microbiol Biotechnol 2008, 15, 121-138.
4. Ausbel F.M. et al. Short protocols in molecular biology. John Wiley and Sons, 1995.

### ORGANIZATION OF BIPHENYL AND POLYCHLORINATED BIPHENYLS DESTRUCTION GENES IN *RHODOCOCCLUS RUBER* P25

Shumkova E. S.<sup>1,2</sup>, Olsson B. E.<sup>2,3</sup>, Plotnikova E. G.<sup>2,4</sup>

<sup>1</sup>A.N. Bach Institute of Biochemistry, RAS, Moscow, Russia; <sup>2</sup>Perm State National Research University, Perm, Russia; <sup>3</sup>University of Skövde, Skövde, Sweden; <sup>4</sup>Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, UB RAS, Perm, Russia

*Rhodococcus ruber* P25 is of interest as an active destructor of biphenyl and polychlorinated biphenyls – highly resistant and dangerous environmental pollutants. Genome sequencing of the strain P25 was conducted with GS Junor (Roche) platform. Biphenyl destruction genes cluster was identified after contigs analysis. It's organization is different from the currently known *bph*-operons.

**Раздел 2**  
**ФИЗИОЛОГИЯ И МЕТАБОЛИЗМ**  
**МИКРООРГАНИЗМОВ**

## БИОПЛЕНКООБРАЗОВАНИЕ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*, ИЗОЛИРОВАННЫХ ОТ ПРАКТИЧЕСКИ ЗДОРОВЫХ ДЕТЕЙ И ИНФИЦИРОВАННЫХ *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

Алиева Л. О., Гордина Е. М., Щукина В. П.,  
Поспелова С. В.

ГБОУ ВПО Пермский государственный медицинский университет имени академика  
Е. А. Вагнера Минздрава России, Пермь, Россия

В сравнительном аспекте изучены частота бактерионосительства *Staphylococcus aureus* практически здоровых и инфицированных микобактериями туберкулеза детей, а также особенности биопленкообразования этих микроорганизмов. Показано, что как у практически здоровых, так и у инфицированных детей эти биотопы контаминированы *S. aureus* практически с одинаковой частотой. Все выделенные штаммы обладали способностью образовывать биопленки. При этом месячная антибиотикотерапия не влияла на интенсивность этого процесса. Штаммы, выделенные от практически здоровых детей, чаще отличались более выраженной степенью интенсивности биопленкообразования.

*Ключевые слова:* биопленкообразование, *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium tuberculosis*.

**Актуальность и цель исследования.** Стафилококки как представители нормофлоры входят в состав микробиоценоза человека. Особенно часто они колонизируют различные участки кожи, слизистые оболочки носа и зева. Стафилококки могут существовать и в виде сложноорганизованных сообществ – биопленок [1], которые являются ключевой фазой бактериального развития, обуславливающего выживание бактерий [2, 3, 4]. Под биопленками принято понимать постоянно обновляющееся сообщество микроорганизмов, закрепившихся на биогенном или абиогенном субстрате, и окруженных полимерным матриксом, который предохраняет их от вредных воздействий и является одним из факторов межклеточного взаимодействия [2, 5]. Биопленкообразование – это сложный комплексный процесс, сформировавшийся в процессе эволюции, как способ выживания в различных условиях обитания. Стафилококки обладают разнообразным набором факторов для его реализации. Это позволяет им «комфортно» существовать в различных условиях, быть защищенными от вредных факторов окружающей среды и, самое главное, противостоять действию раз-

личных антибактериальных препаратов [5, 3]. Известно, что на процесс биопленкообразования могут оказывать влияние различные факторы, в том числе и постоянное применение антибактериальных препаратов [5, 3].

**Цель исследования** – сравнительный анализ степени выраженности биопленкообразования у штаммов *Staphylococcus aureus*, изолированных от практически здоровых детей и инфицированных микобактериями туберкулеза.

**Материалы и методы.** Выполнено бактериологическое исследование 28 мазков со слизистых носа и зева детей, инфицированных микобактериями туберкулеза, которые находились на лечении в Краевом детском санатории «Малыш». Первые пробы (14) забирали при поступлении, вторые – через месяц на фоне противотуберкулезной терапии. Обследованы также на стафилококковое бактерионосительство 36 практически здоровых детей, посещающих детские дошкольные учреждения г. Перми. Обе группы сопоставимы по полу и возрасту.

Выделение культур стафилококков осуществляли традиционным методом с использованием желточно-солевого агара в соответствии с Приказом МЗ СССР № 535 «Об унифика-

ции микробиологических методов исследования, применяемых в клинично-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений», идентифицировали на основании изучения биохимических свойств, используя тест-системы «Staphytest 24» фирмы «ERBA LACHEMA» (Чехия). Оценку результатов осуществляли с помощью компьютерной программы «Микроб-2».

Биопленкообразующую способность *S. aureus* изучали в 96-луночных полистироловых планшетах для иммуноферментного анализа. В 6 лунок каждого ряда планшета вносили по 100 мкл инокулума определенного штамма, содержащего  $10^7$  КОЕ/мл, после чего планшеты инкубировали в течение 24 ч ( $37^\circ\text{C}$ ). Через сутки планктонную культуру удаляли и биопленки дважды промывали 10 мМ фосфатным буфером (рН 7,2), затем окрашивали 0,1% раствором генцианвиолета с последующей спиртовой экстракцией связавшегося красителя. Детекцию окрашенных экстрактов биопленок осуществляли на ридере BenchmarkPlus при длине волны 570 нм. Степень выраженности биопленкообразования (БПО) стафилококков определяли в соответствии с критериями, разработанными S. Stepanovic [1].

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием программы Statistica 6.0. О статистически значимых различиях полученных результатов в сравниваемых группах судили по величине цифровых значений *p*. Критический уровень значимости (*p*) при проверке статистических гипотез в данном исследовании принимался равным 0,05.

**Результаты.** От детей, инфицированных *Mycobacterium tuberculosis*, выделено 33 штамма стафилококков, в том числе 14 изолятов при первичном обследовании (*S. aureus* – 3, коагулазоотрицательных (КОС) – 11) и 19 – при повторном (*S. aureus* – 7, КОС – 12). Таким образом, на фоне специфической антибактериальной терапии инфицированность *S. aureus* биотопов детей статистически значимо выросла – до терапии составила  $21,4 \pm 5,7\%$ , после –  $36,8 \pm 9,8\%$  ( $p=0,009$ ).

Со слизистой оболочки практически здоровых детей изолировано 28 культур стафилококков, из них 12 штаммов *S. aureus*. Инфицированность *S. aureus* биотопов составила  $33,3 \pm 8,8\%$ . Все культуры *S. aureus* независимо от источника выделения характеризовались способностью образовывать биопленки. При

этом более половины штаммов, выделенных от инфицированных детей, при первичном обследовании характеризовались низкой степенью выраженности БПО ( $66,7 \pm 22,2\%$ ), средней –  $33,3 \pm 11,1\%$ . На фоне специфической антибактериальной терапии число штаммов *S. aureus* с низкой степенью БПО увеличилось и составило  $83,3 \pm 27,8\%$ , средней –  $16,7 \pm 5,6\%$ , однако эти различия не были статистически значимы ( $p > 0,05$ ). Следовательно, кратковременная антибактериальная терапия по существу не влияла на интенсивность БПО *S. aureus*.

В последующем проведен сравнительный анализ степени выраженности БПО *S. aureus*, выделенных от детей, инфицированных микобактериями туберкулеза и практически здоровых.  $77,8 \pm 25,9\%$  культур *S. aureus*, изолированных от детей, инфицированных микобактериями туберкулеза, обладали низкой степенью выраженности БПО,  $22,2 \pm 7,4\%$  – средней. Что касается штаммов, выделенных от здоровых детей, то число *S. aureus* с низкой и средней степенью БПО составило по  $50,0 \pm 14,4\%$ . Полученные различия статистически значимы ( $p=0,042$ ). Штаммов с высокой степенью выраженности БПО в том и другом случаях выделено не было.

Таким образом, со слизистой оболочки носоглотки здоровых детей и инфицированных микобактериями туберкулеза, практически с одинаковой частотой изолировали *S. aureus*. Все выделенные культуры обладали способностью к образованию биопленок. Установлено, что кратковременная противотуберкулезная терапия, по существу, не оказывает влияния на интенсивность биопленкообразования *S. aureus*. Изоляты *S. aureus* практически здоровых детей статистически значимо чаще обладали средней степенью выраженности данного признака, в сравнении с культурами, выделенными от инфицированных микобактериями туберкулеза детей, для которых была характерна низкая степень БПО.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Stepanovic S., Vukovic D. et al. APMIS 2007, 115, 891-899.
2. Маянский А. Н., Чеботарь И. В. Журн микробиол 2011, 1, 101-108.
3. Murugan K., Usha M. et al. Pol J Microbiol 2010, 59, 233-239.
4. Speziale P., Rindi S. et al. Curr Med Chem 2008, 15, 3185-3195.
5. Чеботарь И. В. Вестник РАМН 2012, 12, 22-29.

## BIOFILM FORMATION OF *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ISOLATED FROM HEALTHY AND INFECTED CHILDREN WITH *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

Alieva L. O., Gordina E. M., Shchukina V. P., Pospelova S. V.

Academician E. A. Wagner Perm State Medical University, Perm, Russia

In the comparative aspects the frequency of *Staphylococcus aureus* bacteriocarrying of healthy and infected children with *Mycobacterium tuberculosis* and characteristics of biofilm formation of these microorganisms were studied. It was shown in healthy and infected children that these habitats were contaminated by *S. aureus* with the same frequency. All the strains of *S. aureus* formed biofilms. The short-term antibiotic treatment did not affect the intensity of this process. Strains isolated from healthy children were often characterized by stronger degree of intensity of biofilm formation.

## ИЗМЕНЕНИЕ ПАРАМЕТРОВ ДЫХАНИЯ КАК ОТВЕТНАЯ РЕАКЦИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫХ КЛЕТОК НА ВОЗДЕЙСТВИЕ АНТИБИОТИКОВ

Ахова А. В., Ткаченко А. Г.

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

Воздействие антибиотиков вызывает усиление дыхания и повышение соотношения АТФ/АДФ в клетках *E. coli*. Временный подъем соотношения АТФ/АДФ обусловлен резким возрастанием АТФ на фоне медленного роста концентрации АДФ. Под действием фторхинолоновых и бета-лактамовых антибиотиков имеет место усиление процессов потребления кислорода и выделения углекислого газа, что свидетельствует о повышении уровня дыхания в целом.

**Ключевые слова:** АТФ, активные формы кислорода, поглощение кислорода, выделение углекислого газа.

**Актуальность и цель работы.** Увеличение встречаемости антибиотикоустойчивых форм микроорганизмов является одной из актуальных проблем медицины. Более глубокому пониманию процессов формирования антибиотикоустойчивости могло бы способствовать детальное изучение механизмов действия антибиотиков и защитного ответа микроорганизмов. В последнее десятилетие широко обсуждается возможность универсального для всех антибиотиков механизма бактерицидного действия, связанного с усилением продукции активных форм кислорода (АФК) в бактериальных клетках и их самоокислением [1, 2]. Предполагается, что в основе увеличения продукции свободных радикалов в бактериальных клетках под действием антибиотиков

лежит усиление дыхания и, соответственно, работы дыхательной цепи – основного источника АФК [1].

**Целью работы** является исследование параметров дыхания клеток *Escherichia coli*, подвергнутых сублетальному действию антибиотиков разных групп.

**Материалы и методы.** Клетки *Escherichia coli* культивировали на LB-бульоне в микроаэробных условиях при 37 °С. Было изучено действие бета-лактамовых (цефотаксим), фторхинолоновых (левофлоксацин) и аминогликозидных (амикацин) антибиотиков, которые вносили в бактериальную культуру в начале экспоненциальной фазы роста. Оптическую плотность культуры оценивали спектрофотометрически ( $\lambda=600$  нм) Поглощение кислорода и выделе-

ние углекислого газа бактериальной культурой измеряли при помощи респирометра Micro-Oxymax (Columbus Instruments) [3]. Концентрацию адениловых нуклеотидов, экстрагированных из бактериальных клеток хлорной кислотой (0,4 М), определяли методом ВЭЖХ [4].

**Результаты и обсуждение.** Воздействие фторхинолонового и бета-лактаманного антибиотиков вызывало статистически значимое ( $p < 0,05$ ) увеличение потребления кислорода бактериальной культурой по сравнению с контролем (20%- и 30%-ное увеличение, соответственно). Тенденция к усилению потребления кислорода наблюдалась также в условиях воздействия аминогликозида (20%), но эффект не был статистически значимым ( $p = 0,23$ ). В свою очередь, выделение углекислого газа возрастало в присутствии фторхинолона и бета-лактама (15%- и 30%-ное увеличение, соответственно), в отличие от аминогликозида. Это приводило к тому, что в ответ на воздействие фторхинолонового и бета-лактаманного антибиотиков соотношение потребления кислорода к выделению углекислого газа ( $CO_2/O_2$ ) было близко к такому в контрольных условиях. В то же время, в присутствии аминогликозида наблюдалось снижение соотношения  $CO_2/O_2$ , что может свидетельствовать о том, что на то же количество выделяемого углекислого газа приходилось больше потребляемого кислорода по сравнению с контрольными условиями.

Увеличение потребления кислорода бактериальной культурой происходило на начальном этапе воздействия антибиотиков. В дальнейшем, изменение этого показателя зависело от группы антибиотиков: в присутствии цефотаксима потребление кислорода оставалось на более высоком уровне, чем в контрольных условиях (без добавки антибиотика), в случае фторхинолонов – снижалось до контрольного уровня, под действием амикацина – было значительно ниже контрольных значений.

Воздействие всех исследованных групп антибиотиков вызывало медленное накопление АДФ в бактериальных клетках на протяжении всего времени наблюдения (4 часа после внесения антибиотиков) и резкий кратковременный подъем внутриклеточной концентрации АТФ. В клетках, подвергнутых действию антибиотиков, концентрация АДФ на момент окончания наблюдения была в среднем в 1,5-2 раза выше, чем в клетках, выращиваемых в контрольных условиях без добавки антибио-

тиков. Внутриклеточное содержание АТФ при добавке антибиотиков в среднем возрастало в 1,5-3 раза. Увеличение концентрации АТФ и, соответственно, сдвиг в соотношении АТФ/АДФ наблюдался в течение определенного временного интервала, характерного для каждого конкретного антибиотика. Резкий скачок концентрации АТФ происходил через 130-150 минут после внесения левофлоксацина, через 50-60 минут после добавки амикацина и через 20 минут после начала воздействия цефотаксима. Наблюдаемый характерный скачок концентрации АТФ незамедлительно следовал за падением оптической плотности бактериальной культуры, свидетельствующим о начале бактерицидного действия антибиотиков. После резкого подъема, соотношение АТФ/АДФ возвращалось на уровень, наблюдаемый до воздействия, и было ниже или равно такому в контрольных условиях.

Таким образом, под действием антибиотиков происходит увеличение потребления кислорода и выделения углекислого газа бактериальными клетками, что свидетельствует о повышении уровня дыхания в целом. Наблюдается также резкое увеличение соотношения АТФ/АДФ, которое происходит за счет накопления АТФ без снижения концентрации АДФ. Наблюдаемое возрастание внутриклеточной концентрации АТФ происходит, по видимому, не за счет синтеза, а в результате неполной утилизации уже синтезированных молекул из-за торможения энергозависимых процессов (репликации, трансляции и т.п.) под действием антибиотиков. Показанные нами изменения энергетических параметров клетки наиболее вероятно свидетельствуют о торможении основного пути потока электронов в дыхательной цепи и переносе их на кислород в побочных реакциях образования АФК.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РНФ в рамках научного проекта № 15-13-00092.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kohanski M. A., Dwyer D. J., Hayete B., Lawrence C. A., Collins J. J. Cell 2007, 130, 797-810.
2. Liu Y., Imlay J. A. Science 2013, 339, 1210-1213.
3. Kuyukina M. S., Rubtsova E. V., Ivshina I. B., Ivanov R. V., Lozinsky V. I. J Microbiol Methods 2009, 79, 76-81.
4. Akhova A. V., Tkachenko A. G. FEMS Microbiol Lett 2014, 353, 69-76.

## ALTERATION OF THE RESPIRATION OF BACTERIAL CELLS UNDER ANTIBIOTIC TREATMENT

Akhova A. V., Tkachenko A. G.

*Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms UB RAS, Perm, Russia*

The acceleration of cell respiration and the increase of ATP/ADP in response to antibiotic treatment were shown. The temporary sharp rise in ATP/ADP was due to the accumulation of ATP with a slight increase in the ADP content. Fluoroquinolones and beta-lactams caused an acceleration of oxygen consumption and carbon dioxide production showing an increase in the cell respiration rate.

## ВЛИЯНИЕ ПОЛИФЕНОЛ- И ЭКДИСТЕРОИДСОДЕРЖАЩИХ ЭКСТРАКТОВ РАСТЕНИЙ НА УСТОЙЧИВОСТЬ *ESCHERICHIA COLI* К ПЕРОКСИДНОМУ СТРЕССУ И АНТИБИОТИКАМ

Безматерных К. В.<sup>1</sup>, Смирнова Г. В.<sup>1</sup>, Володина С. О.<sup>2</sup>,  
Володин В. В.<sup>2</sup>, Октябрьский О. Н.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь;

<sup>2</sup>Институт биологии Коми НЦ УрО РАН, Сыктывкар, Россия

Экстракты серпухи и пажитника и экдистероидсодержащая субстанция Серпистен снижали ингибирование роста *E. coli* в условиях пероксидного стресса и модифицировали действие антибиотиков, относящихся к различным классам. Серпистен предотвращал лизис бактерий, вызванный  $\beta$ -лактамом цефотаксимом.

**Ключевые слова:** экдистероиды, полифенолы, антибиотики, пероксидный стресс, *Escherichia coli*.

**Актуальность и цель работы.** В современной и традиционной медицине при профилактике и комплексной терапии многих болезней широко используются экстракты лекарственных растений. Среди биологически активных компонентов в составе экстрактов большое внимание привлекают полифенолы (флавоноиды и танины) и экдистероиды. Диета, богатая полифенолами, способствует снижению риска возникновения заболеваний, связанных с окислительным стрессом [1]. Фитоэкдистероиды структурно близки к гормонам линьки членистоногих. Эти соединения не взаимодействуют с рецепторами стероидных гормонов млекопитающих, однако проявляют высокую биологическую активность [2]. Влияние экдистероидов на микробиоту человека слабо изучено: известно лишь, что они не оказывают отрицательного воздействия на ассоциации микроорганизмов, обитающих в кишечнике [3].

**Целью работы** являлось изучение влияния экстрактов серпухи венценовой (*Serratula coronata*), пажитника сенного (*Trigonella foenum graecum*) и экдистероидсодержащей субстанции Серпистен на экспрессию стрессовых регулонов и устойчивость к пероксидному стрессу и антибиотикам у кишечных бактерий *E. coli*.

**Материалы и методы.** Химический состав экстрактов исследовали, определяя общий уровень полифенолов с реактивом Фолина-Чикольте и содержание отдельных полифенолов и экдистероидов методом ВЭЖХ. Измеряли способность экстрактов связывать свободные радикалы DPPH, хелатировать железо и продуцировать  $H_2O_2$  при аутоокислении. В работе использовали штаммы *E. coli*, несущие слияния гена  $\beta$ -галактозидазы (*lacZ*) с промоторами генов *katG*, *katE*, *sodA* и *rpoS*, кодирующих каталазы НРІ и НРІІ, Mn-супероксиддисму-



тазу и регулятор общего стрессового ответа *RpoS*. Бактерии выращивали на среде М9 с добавлением 2 г/л глюкозы, 0,2% казаминовых кислот и 10 мкг/мл тиамин. За ростом следили путем измерения оптической плотности культуры (OD600). Полученные результаты были подвергнуты статистической обработке.

Устойчивость к  $H_2O_2$  и антибиотикам определяли микропланшетным методом. В ячейки планшета добавляли по 5 мкл исследуемых экстрактов и концентрированных клеток, доводили М9 до общего объема 200 мкл и инкубировали на качалках (140 об/мин, 37 °С) 20 мин. Культивирование продолжали в течение 30 мин при пероксидном стрессе (2мМ) и в течение 70 мин при действии антибиотиков: ципрофлоксацина (0,03, 0,3 и 3 мкг/мл), стрептомицина (10 и 40 мкг/мл) и цефотаксима (5 и 10 мкг/мл). Затем отбирали пробы для определения активности  $\beta$ -галактозидазы и колониеобразующей способности. Индекс антиоксидантной активности (АОА) рассчитывали:  $\mu_2 \text{ экстракта} \times \mu_1 \text{ контроля} / \mu_1 \text{ экстракта} \times \mu_2 \text{ контроля}$ , где  $\mu_1$  и  $\mu_2$  – удельная скорость роста бактерий в отсутствие (контроль) и в присутствии экстракта до и после добавления  $H_2O_2$ , соответственно. Активность  $\beta$ -галактозидазы измеряли по методу Миллера. Минимальные ингибирующие концентрации антибиотиков (МИК) определяли методом двойных разведений в иммунологических планшетах.

**Результаты.** Наибольшее количество полифенолов обнаружено в экстракте пажитника (32,4±0,2 мкг/мг). Экстракт серпухи кроме полифенолов (14,4±0,4 мкг/мг) содержал также 20-гидроксиэкдизон (20E) и 25S-инокостерон, которые были основными компонентами Серпистана. По сравнению с серпухой, пажитник в 1,5 раза более эффективно связывал радикалы и хелатировал железо, а также в 3 раза интенсивнее продуцировал  $H_2O_2$ . Серпистен не проявлял хелатирующей активности и демонстрировал слабую способность к аутоокислению, но имел достаточно высокую антирадикальную активность. Экстракты пажитника и серпухи вызвали временное снижение удельной скорости роста на 30% и 14%, соответственно. Серпистен не влиял на рост бактерий. Присутствие экстрактов серпухи и пажитника в среде повышало экспрессию генов *katG* и *sodA* в 1,3–1,4 раза, ингибировало экспрессию *rpoS* на 14% и 35%, соответственно, и не оказывало воздействия на экспрессию

*katE*. Серпистен не изменял экспрессию *katG*, *katE* и *rpoS*, но индуцировал *sodA* в 1,2 раза. Наблюдаемые эффекты экстрактов на рост и экспрессию генов могут быть следствием активности входящих в их состав полифенолов, аутоокисление которых продуцирует АФК, активирующие АО регулоны.

Экстракты серпухи и пажитника и, в меньшей степени, Серпистен оказывали защитное действие на рост *E. coli*, обработанной 2 мМ  $H_2O_2$ . Средний индекс АОА в четырех изученных штаммах *E. coli* составлял 4,5 для серпухи, 5,7 для пажитника и 2,1 для Серпистана. Таким образом, АО эффект в большей степени проявляли экстракты, богатые полифенолами, чем Серпистен, содержащий экдистероиды. Это согласуется с ранее полученными данными [4], что флавоноидсодержащая фракция экстракта *S. coronata* была более эффективна в качестве антиоксиданта при перекисном окислении липидов, чем экдистероидсодержащая. Механизм АО действия полифенолов может быть связан как с их способностью повышать экспрессию гена *katG* и, соответственно, каталазную активность клеток, так и со способностью хелатировать внутриклеточное железо, уменьшая продукцию токсичных гидроксильных радикалов. АО эффект Серпистана максимально проявлялся в штамме, мутантном по гену *sodA* (индекс АОА 3,9), и мог быть опосредован антирадикальной активностью экдистероидов.

Исследуемые субстанции различным образом модулировали действие антибиотиков на бактерии *E. coli* в зависимости от типа антибиотика и используемого теста. Присутствие экстрактов серпухи и пажитника в среде в 2 раза повышало МИК для стрептомицина, канамицина и цефотаксима, но не оказывало влияния на МИК для ципрофлоксацина. Серпистен не изменял МИК для всех антибиотиков. Экстракты серпухи и пажитника в 1,4–2 раза замедляли падение скорости роста бактерий, вызванное ципрофлоксацином и стрептомицином, и существенно подавляли лизис, индуцированный 5 мкг/мл цефотаксима. Примечательно, что Серпистен, практически не оказывавший влияния на скорость роста в присутствии ципрофлоксацина и стрептомицина, полностью предотвращал лизис клеток при добавлении цефотаксима. Защитный эффект Серпистана от цефотаксима сохранялся в тесте на образование колоний: количество

КОЕ возрастало в 5 раз при концентрации антибиотика 10 мкг/мл. При экспозиции *E. coli* к ципрофлоксацину (0.03 и 3 мкг/мл) экстракты серпухи, пажитника и Серпистен увеличивали КОЕ в 1,5–2 раза. Таким образом, модулирующее влияние субстанций на рост *E. coli* в присутствии антибиотиков, по-видимому, определяется содержанием полифенолов, в то время как за предотвращение лизиса, вызванного цефотаксимом, могут отвечать эдистероиды. Механизм воздействия эдистероидов на мембраны остается неизвестным. Для клеток млекопитающих показано, что 20E снижает продукцию малоновых диальдегидов при окислительном повреждении мембран. Протекторное действие полифенолов может быть связано с их влиянием на рост,

экспрессию АО генов и хелатирование железа, что способствует повышению устойчивости к различным стрессам. Модулирующий эффект полифенолов и эдистероидов должен учитываться при терапии с использованием антибиотиков. Исследования поддержаны грантами РФФИ № 13-04-00706, 13-04-96039, 14-04-96031.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Nijveldt R. J., et al. Am J Clin Nutr 2001, 74 (4), 418-425.
2. Lafont R. Теоретическая и прикладная экология 2012, 1, 6–12.
3. Тимофеев Н. П. Бутлеровские сообщения 2006, 1–30.
4. Barthoria M., et al. Fitoterapia 2004, 75, 162-167.

### INFLUENCE OF POLYPHENOL- AND ECDYSTEROID-CONTAINING EXTRACTS ON *ESCHERICHIA COLI* SUSCEPTIBILITY TO PEROXIDE STRESS AND ANTIBIOTICS

Bezmaternykh K. V.<sup>1</sup>, Smirnova G. V.<sup>1</sup>, Volodina S. O.<sup>2</sup>,  
Volodin V. V.<sup>2</sup>, Oktyabrsky O. N.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, UB RAS, Perm;

<sup>2</sup>Institute of Biology, RAS, Syktyvkar, Russia

Extracts from *Serratula coronata* and *Trigonella foenum graecum* and the ecdysteroid-containing supplement Serpisten decreased a growth inhibition of *E. coli* under peroxide stress and modified the action of antibiotics belonging to different classes. Serpisten prevented bacterial lysis provoked by  $\beta$ -lactam cefotaxime.

### ТОКСИН VarC ИНДУЦИРУЕТ ПЕРЕХОД *MYCOBACTERIUM SMEGMATIS* В ПОКОЯЩЕЕСЯ СОСТОЯНИЕ

Гончаренко А. В., Демиденко О. И.

ИНБИ РАН, Москва, Россия

Предполагается, что токсины TA локусов принимают участие в формировании покоящегося состояния микобактерий. В представленной работе было продемонстрировано, что гиперэкспрессия токсина VarC в *Mycobacterium smegmatis* приводит к формированию морфологически отличных овоидных микобактерий. Овоидные клетки были нерепликативны, не включали меченый урацил и не дышали, что указывает на их покоящееся состояние.

*Ключевые слова:* токсин-антитоксиновые локусы, микобактерии, дормантность.

**Актуальность и цель работы.** Проблема борьбы с туберкулезом, опережающим по уровню смертности другие инфекции

и уносящим около 2 миллионов человеческих жизней ежегодно, существенно осложняется тем, что микобактерии способны

выживать в латентном (неактивном) состоянии. Для борьбы с туберкулезом необходимо понимание механизмов перехода его в латентную форму. Поскольку переход в покоящееся состояние сопровождается значительным снижением метаболизма, падением количеств мРНК и рРНК, можно ожидать участие в этом процессе таких факторов как эндорибонуклеазы так называемых токсин-антитоксिनных (ТА) систем, в частности, рибонуклеазы *VarC*, гидролизующей мРНК и рРНК [1].

**Целью** данного исследования стало изучение токсина *VarC* ТА семейства *varBC* в формировании покоящегося состояния *Mycobacterium smegmatis*.

**Материалы и методы.** В качестве объекта исследования был выбран штамм *Mycobacterium smegmatis* mc<sup>2</sup>155 (wt).

**Клонирование.** Клонирование проводили с использованием штамма *E. coli* TG1. Амплификацию гена *varC* *M. smegmatis* осуществляли с праймеров 5'GGGGATCCGGAGGAATAATGGTTATCGACACTTCTGC3' и 5'GCTGCAGCGCGGCGTTGGGGTTGGACTGACC3' (сайты рестрикции *Bam*HI и *Pst*I подчеркнуты). ПЦР-продукты клонировали в вектор pGEM-T (Promega), затем подвергали расщеплению по сайтам *Bam*HI и *Pst*I, далее лигировали в вектор pMind по указанным сайтам. Экспрессию индуцировали добавлением 20 нг/мкл тетрациклина.

**Включение радиоактивной метки.** Уровень синтеза РНК определяли по включению [5,6 <sup>3</sup>H] урацила. К 1 мл суспензии клеток добавляли 1 мкл [5,6 <sup>3</sup>H] урацила и инкубировали в течение 4 часов при 37°C при постоянном перемешивании. Далее 0,2 мл полученного образца переносили в 15 мл 10% ТХУ (20 мин., 0°C). Затем клетки, после нанесения на стеклянный фильтр GFC («Whatman»), отмывали 3-5 объёмами 10% ТХУ и 96% этанола. После высушивания фильтры помещали в сцинтилляционную жидкость.

**Определение дыхательной активности.** Дыхательную активность клеток измеряли по скорости поглощения ими кислорода в термостатируемой полярографической ячейке с закрытым кислородным электродом типа Кларка. Реакционная смесь содержала 50 мМ фосфатный буфер (рН 7,0) и клеточный компонент. Исследуемый материал вносили в объёме 1 мл. Температура измерения 25°C.

**Изучение чувствительности клеток к действию стрессовых факторов.** Термоустойчивость клеток определяли по соотношению титров КОЕ после прогревания в диапазоне температур от 60°C до 80°C в течение 10 минут. Долю устойчивых к антибиотику клеток определяли по соотношению титров КОЕ после 24 – часовой инкубации клеток в присутствии различных концентраций антибиотика рифампицина (25, 50 и 100 мкг/мл). Перед высевом обработанные клетки отмывали 50 мМ фосфатным буфером (рН 7,0) Для определения числа КОЕ клетки высевали на чашки Петри с твёрдой питательной средой.

**Результаты.** Для подтверждения гипотезы об участии токсина *VarC* в процессе перехода микобактерий в покоящееся состояние, был получен штамм wt – *varC*, осуществляющий гиперэкспрессию токсина *VarC* в *M. smegmatis*.

Показано, что после индукции экспрессии токсина *varC* в клетках *M. smegmatis* рост рекомбинантного штамма wt – *varC* останавливался, о чём свидетельствовало отсутствие изменения значения оптической плотности исследуемой культуры и числа КОЕ.

Обнаружено, что экспрессия токсина *VarC* приводит к образованию морфологически измененных овоидных клеток *M. smegmatis*. Количество измененных клеток в культуре варьировало от 20% до 90%. Изменения происходили в течение 120 часов; далее, если клетки оставляли при комнатной температуре неподвижными, они сохраняли измененную морфологию в течение месяца наблюдений. Важно отметить, что полученные овоидные формы сохраняли способность к восстановлению роста на твёрдых питательных средах, демонстрируя обратимость действия токсина *VarC*, что соответствует нашему представлению о роли токсина при переходе клеток в состояние покоя. Ранее в нашей лаборатории было показано, что подобные овоидные формы образуются при переходе клеток *M. smegmatis* в покоящееся состояние [2].

**Физиологические свойства овоидных форм рекомбинантного штамма wt – *varC* *M. smegmatis*.**

**Метаболическая активность.** Для оценки уровня метаболической активности овоидных форм, полученных при индукции токсина *VarC*, в клетки был введён радиоактивный предшественник нуклеиновых кислот –

[5,6  $^3\text{H}$ ] урацил. Было показано, что по сравнению с логарифмическими и стационарными клетками, метаболическая активность которых находилась на довольно высоком уровне, овоидные формы штамма wt – *vapC* характеризовались низким уровнем включения радиоактивного предшественника, что свидетельствовало о снижении уровня транскрипции в клетках.

Овоидные клетки штамма wt – *vapC* также не обнаружили дыхательной активности, о чём свидетельствовало отсутствие изменения концентрации кислорода. В то же время, логарифмические и стационарные клетки контрольного штамма wt характеризовались высокой дыхательной активностью, что выражалось в уменьшении концентрации кислорода в среде.

Овоидные формы, образованные в результате индукции токсина VapC обладали повышенной устойчивостью к действию высоких температур в диапазоне 60–80°C по сравнению с вегетативными клетками стационарной фазы. Так, при прогревании суспензий клеток при 70°C в течение 10 минут доля неповрежденных овоидных клеток была на 2 порядка больше, чем вегетативных клеток. Кроме

того, овоиды продемонстрировали большую устойчивость к добавке антибиотика рифампицина: при воздействии 100 мкг/мл антибиотика на стационарные клетки штамма wt *M. smegmatis* в течение 24 ч количество выживших клеток падало на 4 порядка, тогда как количество овоидных форм штамма wt – *vapC* оставалось практически неизменным.

Таким образом, нами впервые было продемонстрировано, что гиперэкспрессия токсина VapC в клетках *M. smegmatis* приводит к изменению клеточной морфологии (образованию овоидных форм), снижению уровня метаболизма и дыхания. Полученные овоидные клетки характеризуются большей устойчивостью к воздействию стрессовых факторов (повышенные температуры и резистентность к воздействию антибиотика) по сравнению с вегетативными клетками, что позволяет отнести их к покоящимся формам бактерий.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Arcus V.L., McKenzie J.L., Robson J., Cook G.M. Protein Eng Des Sel 2011, 24, 1–2, 33–40.
2. Anuchin A.M., Mulyukin A.L., Suzina N.E., Duda V.I., El-Registan G.I. Kaprelyants A.S. Microbiology 2009, 155, 4, 1071–1079.

### VapC TOXIN INDUCES TRANSITION OF MYCOBACTERIA IN DORMANT STATE

Goncharenko A. V., Demidenok O. I.

INBI RAS, Moscow, Russia

Participation in formation of the dormant state in mycobacteria is suggested to be a possible function of toxins encoded by TA loci. In this work, we demonstrated that overexpression of VapC toxin in *Mycobacterium smegmatis* results in development of morphologically distinct ovoid cells. The ovoid cells were non-replicating and revealed a low level of uracil incorporation and respiration, which indicated their dormant status.

## ДЕЙСТВИЕ АНТИСЕПТИКОВ НА БИОПЛЕНКИ КЛИНИЧЕСКИХ ШТАММОВ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* В МОНОКУЛЬТУРЕ И В АССОЦИИ С *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

Еньчева Ю. А.<sup>1</sup>, Колоколова А. А.<sup>1</sup>, Кузнецова М. В.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>ГБОУ ВПО «ПГМУ им. ак. Е. А. Вагнера» МЗ РФ, Пермь; <sup>2</sup>ФГБУН Институт  
экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь, Россия

Изучено действие 0,5% раствора хлоргексидина биглюконата и «Пронтосана®» на «зрелые» биопленки, сформированные клиническими изолятами *P. aeruginosa* в монокультуре и в ассоциации с *S. aureus* ATCC®29213 *in vitro*. Уменьшение массивности моновидовой биопленки выявлено только при экспозиции с «Пронтосаном®» ( $p=0,00437$ ), тогда как для смешанной – достоверность отличий от контроля показана для обоих антисептиков. При оценке жизнеспособности клеток после воздействия хлоргексидина обнаружено, что число КОЕ статистически значимо снижалось как в моновидовых ( $p=0,01172$ ), так и в смешанных биопленках ( $p=0,04312$ ). «Пронтосан®» полностью подавлял способность бактериальных клеток к росту во всех вариантах биопленок.

**Ключевые слова:** *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, биопленки, хлоргексидин, «Пронтосан®»

**Актуальность и цель работы.** Бактерии *Pseudomonas aeruginosa* и *Staphylococcus aureus* являются сильными антагонистами. Тем не менее, ассоциации представителей данных видов, в том числе в составе многокомпонентных сообществ, могут встречаться в раневом отделяемом больных ожоговых и реанимационных отделений [1, 2]. Известно, что в «зрелых» биопленках бактерии защищены от влияния антибактериальных веществ, что часто является основной причиной неэффективности последних [3]. Предполагая, что действие антисептических препаратов, применяемых в хирургической практике, будет существенно отличаться при моновидовой и смешанной инфекциях, представлялось важным изучить влияние антисептиков на моновидовые и полимикробные биопленки *in vitro*.

**Цель работы:** оценить влияние хлоргексидина и «Пронтосана®» на моновидовые и смешанные биопленки, образованные бактериями *P. aeruginosa* и *S. aureus*.

**Материалы и методы.** Объектами для изучения служили референтные штаммы *P. aeruginosa* ATCC®27853 и *S. aureus* ATCC®29213 и клинические изоляты *P. aeruginosa* ( $n=12$ ). Биопленки формировали статически в усло-

виях термостата в течение суток в полистироловых плоскодонных 96-ти луночных планшетах («Медполимер», Россия) в моновидовом и микст варианте. После удаления планктонной культуры в опытную часть лунок вносили 0,5% раствор хлоргексидина биглюконата или «Пронтосан®» (ундециленовый амидопропил-бетаин 0,1%, полиаминопропил бигуанид/полигексанид 0,1%), выдерживали 1 ч, 3-хратно отмывали 0,1 М фосфатно-буферной средой (ФБС, pH 7,2±0,2). В контрольные лунки (без антисептика) на срок экспозиции добавляли ФБС. Биомассу биопленки оценивали по уровню экстракции этанолом 0,1% водного раствора генцианвиолета, который измеряли на микропланшетном ридере Benchmark Plus (Bio-Rad, США) при длине волны 580 нм в единицах оптической плотности (Ед, ОП<sub>580</sub>). Для оценки жизнеспособности клеток в биопленках последние 3-хкратно отмывали, вносили в лунки ФБС и обрабатывали ультразвуком 5-икратно в течение 1 мин при 37 кГц, поместив планшеты в ультразвуковую ванну Elma Ultrasonic 30S (Elma, Германия). Жизнеспособность клеток оценивали по числу колониеобразующих единиц (КОЕ) при высеве последовательных десятичных разведений

из бактериальных суспензий на агаризованную среду Луриа-Бертани. Статистическую обработку данных проводили с использованием компьютерной программы «Statistica 5».

**Результаты.** Установлено, что биомасса 24-часовой биопленки, сформированной клиническими изолятами *P. aeruginosa*, статистически значимо уменьшалась после воздействия «Пронтосана®» у 9 штаммов (75%), тогда как хлоргексидин не оказывал подобного эффекта ни в одном случае. Установлено, что показатель, характеризующий величину/массивность биопленки, в контроле варьировал в пределах от  $0,093 \pm 0,013$  до  $0,430 \pm 0,019$  ед. ОП<sub>580</sub>, медиана (квартили) составили 0,148 (0,128–0,213) ед. ОП<sub>580</sub>, после воздействия хлоргексидина – 0,187 (0,166–0,205), а «Пронтосана®» – 0,071 (0,067–0,093) ед. ОП<sub>580</sub>. Достоверность отличий в группах выявлена для пары контроль/«Пронтосан®» ( $p=0,00437$ ) и пары хлоргексидин/«Пронтосан®» ( $p=0,00054$ ). Биомасса биопленки, образованной клиническими изолятами *P. aeruginosa* и штаммом *S. aureus* ATCC®29213, была достоверно больше, чем при росте штаммов синегнойной палочки в моновидовом варианте ( $p=0,00028$ ). Величина показателя полимикробной биопленки варьировала в пределах от  $0,186 \pm 0,067$  до  $0,667 \pm 0,089$  ед. ОП<sub>580</sub>, Ме (Q1-Q3) составили 0,365 (0,284–0,476) ед. ОП<sub>580</sub>. Аналогичные данные показаны Шипицыной И. В. и Осиповой Е. В. (2014), которые исследовали биопленкообразующую способность псевдомонад и стафилококков, выделенных из клинического материала в ассоциациях. После воздействия хлоргексидина в 10-и случаях зафиксирована тенденция к снижению показателя массивности биопленки, тогда как при экспозиции с «Пронтосаном®» во всех вариантах (100%) установлено статистически значимое снижение биомассы. Тем не менее достоверность отличий в группах выявлена для обеих пар – контроль/«Пронтосан®» ( $p=0,0022$ ), контроль/хлоргексидин ( $p=0,04139$ ).

При оценке жизнеспособности клеток в моновидовых биопленках, образованных *P. aeruginosa*, обнаружено, что число КОЕ в контроле варьировало от  $4,00E+05$  до  $3,27E+07$ , Ме (Q1-Q3) составили  $3,32E+06$  ( $7,33E+05$  –  $7,00E+06$ ). Интересным представляется факт, что не было обнаружено корреляции между массивностью биопленки *P. aeruginosa* (ед. ОП<sub>580</sub>) и количеством жизнеспособных клеток в ее составе ( $r=-0,26549$ ). После экспозиции биопленок

с хлоргексидином количество жизнеспособных клеток статистически значимо снизилось до  $3,12E+04$  ( $4,00E+03$  –  $4,77E+05$ ) ( $p=0,01172$ ), а при воздействии «Пронтосана®» их не было выявлено ни в одном варианте. Данные, полученные для смешанной биопленки, были сходными: хлоргексидин достоверно снижал число жизнеспособных клеток во всех вариантах, медиана составила  $1,40E+07$  для контроля и  $1,77E+03$  для антисептика ( $p=0,04312$ ), тогда как «Пронтосан®» полностью подавлял способность бактериальных клеток к росту. Несмотря на то, что количество клеток в исходной смешанной биопленке в большинстве вариантов было выше, чем в моновидовой, после воздействия хлоргексидина число КОЕ, наоборот, составило  $1,77E+03$  для смешанной против  $3,12E+04$  для моновидовой, хотя разница оказалась статистически незначимой ( $p=0,22492$ ).

Проведенное исследование позволило получить информацию о влиянии двух наиболее часто применяемых в хирургической практике антисептиков на «зрелые» биопленки, сформированные клиническими изолятами *P. aeruginosa* в моноварианте и в ассоциации с референтным штаммом *S. aureus*. Показано преимущество «Пронтосана®» в отношении как моновидовых, так и полимикробных биопленок, которое обусловлено действием амидопропил-бетаина, обладающего свойствами поверхностно-активного вещества, разрушающего биопленочную структуру, в результате чего бактерицидный компонент действует очень эффективно. Выявлено, что хлоргексидин, практически не влияя на биомассу псевдомонадных биопленок, оказывает разрушающее воздействие на биопленки, сформированные в смешанной культуре с *S. aureus*, хотя полного подавления жизнеспособности бактерий не обнаружено. Таким образом, с помощью показателей, характеризующих массивность биопленки и жизнеспособность сессильных клеток, можно оценить клиническую эффективность антисептических препаратов: бактерицидную активность и способность разрушать структуру биопленки, что ускоряет элиминацию возбудителя.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бондаренко Е. В., Лапа Т. М., Сергеева Л. Г., Дементьева Л. М. Инфекция и иммунитет 2012, 1–2, 473–474.

2. Шипицына И. В., Осипова Е. В. Успехи современного естествознания 2014, 11, 18-21.
3. Van Acker H., Van Dijk P., Coenye T. Trends in Microbiol 2014, 6, 326-333.

## ANTISEPTIC AGENTS' EFFECT ON BIOFILMS OF NOSOCOMIAL STRAINS OF *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* AND *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

Encheva Y. A.<sup>1</sup>, Kolokolova A. A.<sup>1</sup>, Kuznetsova M. V.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>E.A. Vagner Perm State Medical Academy; <sup>2</sup>Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms UB RAS, Perm, Russia

The effect of 0.5% chlorhexidine bigluconate solution and «Prontosan®» on «mature» biofilms formed by nosocomial isolates *P. aeruginosa* was studied in monoculture and in association with *S. aureus* ATCC® *in vitro*. Reducing of the monospecies biofilm solidity was only revealed under the «Prontosan®» exposure ( $p=0.00437$ ), whereas in the case of mixed biofilm the reliability of differences from the control values was demonstrated for both antiseptics. The assessment of cell viability as a result of chlorhexidine action showed that CFU number was statistically significantly reduced both in monospecies ( $p=0.01172$ ) and in mixed biofilms ( $p=0.04312$ ). «Prontosan®» was found to completely suppress the bacterial cell ability to grow in all types of biofilms.

---

## ВЛИЯНИЕ АУТОЛИЗАТОВ И КУЛЬТУРАЛЬНЫХ ЖИДКОСТЕЙ БАКТЕРИЙ *STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS* НА ИХ АДГЕЗИЮ К ПОЛИСТИРОЛУ

Ерошенко Д. В., Филатова Л. Б.

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

Проведено изучение действия бесклеточных сред культивирования разных фаз роста планктонной популяции *S. epidermidis* ГИСК 33 на первые этапы колонизации поверхности полистирола этими же бактериями. Показано, что фильтраты культуральной жидкости логарифмической и стационарной фаз роста в 2–6 раз подавляют сорбцию на поверхности полистирола бактерий *S. epidermidis* ГИСК 33 обеих фаз роста. Внесение в среду инкубации 1% аутолизатов бактериальных клеток экспоненциальной фазы роста оказывало аналогичное действие на адгезию стафилококков как до, так и после термической обработки лизатов. Таким образом, можно предполагать, что процесс роста планктонной популяции *S. epidermidis* ГИСК 33 сопровождается секрецией бактериальными клетками в окружающую их среду факторов, препятствующих адгезии бактерий этого же штамма к поверхности полистирола.

**Ключевые слова:** адгезия, аутолизат, культуральная жидкость, полистирол.

**Актуальность и цель работы.** Формирование биопленок бактериями *Staphylococcus epidermidis*, относящихся к обычным резидентам кожных покровов и слизистых человека и животных, является одной из важнейших и часто встречающихся причин внутрибольничных устройств-ассоциированных инфек-

ций [1]. Поскольку первые этапы прикрепления бактериальных клеток к абиотическим субстратам считаются ключевыми в процессе формирования ими биопленок, целью настоящей работы являлось изучение влияния факторов, накапливаемых во внеклеточной среде в процессе роста планктонной культуры *S. epi-*

*dermidis*, на процессы адгезии этих же бактерий к поверхности полистирола.

**Материалы и методы.** Бактерии *S. epidermidis* ГИСК 33 (ГКПМ «НЦЭСМП» МЗ РФ, Москва) выращивали до достижения экспоненциальной или стационарной фаз роста на среде LB при 37 °С и 160 об/мин, затем клетки промывали физиологическим раствором, суспендировали в различных средах до конечного содержания бактерий  $10^7$  КОЕ/мл и в объеме 2 мл вносили в полистироловые чашки Петри (40 мм, «Медполимер», Россия) для изучения адгезионных свойств. В качестве инкубационной среды использовали физиологический раствор NaCl, 10 мМ натрий-фосфатный буфер (рН 7,2, ФБ), питательную среду LB, а также стерилизованные фильтрованием (0,22 мкм) культуральные жидкости с лог- и стационарной фаз роста бактериальной популяции или 1% растворы аутолизатов бактерий обеих фаз роста. После инкубации (37 °С, 30 мин) жидкую часть культур удаляли аспирацией, а поверхности чашек трижды осторожно промывали 10 мМ ФБ (рН 7,2). Количество связавшихся с поверхностью полистирола бактерий оценивали прямым подсчетом клеток после окрашивания генцианвиолетом (0,1%), просматривая по 10 полей зрения в каждой чашке при увеличении  $\times 2500$  на микровизоре  $\mu$ Viso-103 («Ломо», Россия) [2]. Для получения аутолизатов бактерии *S. epidermidis* логарифмической и стационарной фаз роста отделяли от культуральной жидкости центрифугированием (12000xg, 5 мин), суспендировали в физ. растворе в 1/100 исходного объема и оставляли на 16-18 ч при 37 °С. Затем проводили один цикл замораживания (-20 °С) и оттаивания (37 °С), после чего надосадочную жидкость отделяли центрифугированием (12000xg, 5 мин) и использовали для приготовления 1% растворов в физиологическом растворе. В ряде экспериментов полученные препараты подвергали термической обработке путем кипячения на водяной бане в течение 20 мин. Количество живых клеток определяли стандартным методом высева аликвот десятикратных разведений на плотную среду LB. Полученные результаты подвергали статистической обработке методом ANOVA.

**Результаты.** Использование бесклеточных культуральных жидкостей с разных фаз роста планктонной популяции как адгезионной среды приводило к снижению числа сорби-

рующихся бактерий *S. epidermidis* 33 на поверхности полистирола. При этом, адгезия бактерий лог- (26,9 $\pm$ 1,5 клеток/ поле зрения) и стационарной фаз роста (14,8 $\pm$ 1,5 клеток/ поле зрения) в фильтрате среды с лог-фазы роста была значительно ниже по сравнению со значениями в свежей питательной среде LB (46,6 $\pm$ 3,2 клеток/ поле зрения для бактерий лог- и 39,1 $\pm$ 2,7 клеток/ поле зрения для бактерий стационарной фаз роста). В то же время, ингибирующая способность фильтратов среды стационарной фазы роста (16 ч) была практически в 2 раза выше определяемой в фильтрате среды лог-фазы (4 ч). Так, количество сорбированных клеток лог- и стационарной фаз роста в этих условиях составляло 13,7 $\pm$ 1,2 клеток/ поле зрения и 6,2 $\pm$ 0,6 клеток/ поле зрения, соответственно. Показано также, что фильтраты обеих сред не обладали антибактериальным действием, так как в их присутствии количество живых клеток обеих фаз роста существенно не изменялось и оставалось на уровне контроля ((1,5 $\pm$ 0,3)  $\times 10^7$  КОЕ/мл).

Одновременно с этим, не было установлено связи между обнаруженным эффектом и истощением питательных компонентов среды, поскольку, несмотря на то, что количество сорбированных клеток лог-фазы роста в физиологическом растворе (30,9 $\pm$ 3,3 клеток/ поле зрения) или 10 мМ фосфатном буфере (29,6 $\pm$ 1,3 клеток/ поле зрения) было ниже, чем в питательной среде LB (46,6 $\pm$ 3,2 клеток/ поле зрения), даже в этих условиях сорбция бактерий была практически в два раза выше, чем в фильтратах среды со стационарной фазы роста (13,7 $\pm$ 1,2 клеток/ поле зрения).

Вместе с тем, показано, что внесение в среду инкубации даже небольшого количества (1%) аутолизатов бактерий *S. epidermidis* 33 экспоненциальной фазы роста вызывало снижение сорбционных характеристик бактерий этого же штамма практически на треть – 27,9 $\pm$ 2,4 клеток/ поле зрения в среде без добавления аутолизатов и 17,0 $\pm$ 1,6 клеток/ поле зрения в их присутствии. В то же время, лизаты бактерий стационарной фазы роста не оказывали заметного влияния на адгезию бактерий – 34,8 $\pm$ 4,5 клеток/ поле зрения в присутствии лизатов и 27,9 $\pm$ 2,4 клеток/ поле зрения в контрольной среде. Следует отметить, что термическая обработка аутолизатов бактерий обеих фаз роста популяции не меняла характера их влияния на адгезионные свойства бактерий *S. epidermidis* 33, что ис-



ключает вероятность ферментативной природы обнаруженного эффекта.

Вместе с тем, как указывалось выше, фильтраты культуральной жидкости со стационарной фазы роста практически в 4 раза подавляли сорбцию бактерий *S. epidermidis* 33. Возможно, это связано с постепенным переходом обнаруженных факторов ингибирования из бактериальных клеток в окружающее их пространство в процессе бактериального роста. Данный эффект особо интересен в связи с тем, что аутологичная внеклеточная ДНК и основной аутолизин стафилококков AtlE, которые являются характерными компонентами бактериальных лизатов, способствуют увеличению количества связанных с поверхностью полистирола бактерий *S. epidermidis* [3, 4].

Таким образом, результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что в процессе роста планктонной популяции бактерий *S. epidermidis* ГИСК 33 происходит накопление во внеклеточной среде факторов,

препятствующих адгезии бактерий того же штамма к поверхности полистирола. Механизм такого явления до конца неясен, однако, вероятнее всего, он не связан с появлением в среде внеклеточных гидролитических ферментов.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (№ 14–04–00687) и Минобрнауки Пермского края (проект МИГ, соглашение № С-26/632).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sievert D. M., Ricks P., Edwards J. R., Schneider A., Patel J. et al. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2013, 34 (1), 1–14.
2. Ерошенко Д. В., Лемкина Л. М., Коробов В. П. *Вестник ПГУ. Биология*. 2012, 1, 29–33.
3. Ерошенко Д. В., Лемкина Л. М., Коробов В. П. *Биология – наука XXI века: тез. докл. 18-й Международной Пущинской школы-конференции молодых ученых*, Пущино, 21–25 апр. 2014 г., 203–204.
4. Heilmann C., Hussain M., Peters G., Götz F. *Mol Microbiol* 1997, 24 (5), 1013–1024.

### INFLUENCE OF *STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS* LYSATES AND CULTURE MEDIUM ON THEIR ADHESION TO POLYSTYRENE

Eroshenko D. V., Filatova L. B.

*Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, UB RAS, Perm, Russia*

The influence of cell-free culture medium from different *S. epidermidis* GISK 33 growth phases on the first stages of polystyrene surface colonization by the same bacteria was evaluated. The logarithmic and stationary phase culture medium filtrate reduced the sorption of staphylococcal cells of both growth phases by 2–6-fold in comparison with control. The 1% solution of bacterial cell autolysate from the exponential growth phase cells had the similar inhibiting effect on staphylococcal adhesion even after the autolysate thermal treatment. Thus, the growth of *S. epidermidis* GISK 33 planktonic population was accompanied by the bacterial cell factors' secretion into environment that prevented the adhesion of these bacteria to the polystyrene surface.

## ВОЗМОЖНЫЕ МЕХАНИЗМЫ УСТОЙЧИВОСТИ *RHODOCOCCLUS RUBER* К ВОЗДЕЙСТВИЮ *n*-ДЕКАНА

Коршунова И. О.<sup>1</sup>, Рубцова Е. В.<sup>1,2</sup>, Куюкина М. С.<sup>1,2</sup>,  
Ившина И. Б.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь;

<sup>2</sup>Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

Изучены возможные механизмы устойчивости штамма *Rhodococcus ruber* ИЭГМ 231 к воздействию *n*-декана. Отмечено увеличение относительной площади и микрорельефа поверхности клеток родококков. *n*-Декан оказывает влияние на ультраструктурные компоненты клеточной стенки, снижая шероховатость нанорельефа и показатель упругости клеток. Показано, что родококки используют протон- и натрий-зависимые эффлюксные насосы для выведения избытка *n*-декана из клеток и осуществляют окислительную деструкцию углеводорода.

**Ключевые слова:** родококки, *n*-декан, АСМ, КЛСМ, эффлюксные насосы, респирометрия

**Актуальность и цель работы.** Бактерии, устойчивые к органическим растворителям, применяются в производстве особо чистых реактивов, биотоплива, ароматизаторов для пищевой промышленности и фармацевтических препаратов. Использование резистентных штаммов позволяет осуществлять трансформацию гидрофобных соединений в присутствии чистых растворителей или в водно-органической системе и получать стабильные продукты биокаталитических реакций [1]. Известно, что органические растворители нарушают структурную и функциональную целостность мембран, снижают количество поперечных сшивок в пептидогликане клеточных стенок и вызывают изменения морфологии и размеров клеток микроорганизмов [2]. Важными фактором устойчивости бактерий к органическим растворителям является наличие мощной клеточной стенки, выступающей в качестве физического барьера, и работа эффлюксных насосов, откачивающих токсические соединения, проникшие в клетку [3]. Актинобактерии рода *Rhodococcus* – актуальные объекты биотехнологических исследований [4].

**Цель работы** – изучение возможных механизмов устойчивости родококков к воздействию *n*-декана.

**Материалы и методы.** Бактериальный штамм *Rhodococcus ruber* ИЭГМ 231 из Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов (акроним ИЭГМ, WDCM # 768; [www.iegm.ru/iegmcol/strains](http://www.iegm.ru/iegmcol/strains)) инкубировали в присутствии *n*-декана в течение 1 сут.

Визуализацию клеток родококков осуществляли с помощью интегрированной системы, состоящей из лазерного конфокального микроскопа (КЛСМ) Olympus FV1000 (Olympus Corporation) и атомно-силового микроскопа (АСМ) Asylum MFP-3D-BIO™ (Asylum Research). Получение КЛСМ-изображений осуществляли с помощью красителя LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kits (Invitrogen). Для АСМ сканирования на воздухе (размер изображений – 10-12 мкм или 200 нм) использовали кантилеверы AC240TS (Olympus Corporation).

Обработку и совмещение КЛСМ- и АСМ-изображений осуществляли с помощью программ FV10-ASW (Olympus Corporation) и Igor Pro 6.22A (WaveMetrics).

Нано-механические характеристики родококков, иммобилизованных на модифицированном поли-L-лизинном (0,1 мг/мл) стекле, исследовали с помощью АСМ в натрий-фосфатном буфере с использованием кантилеверов TR400PB (Olympus Corporation).

Для определения эффективности работы эффлюксных насосов суспензию родококков (ОП<sub>600</sub> 0,05) вносили в среду LB с добавлением 20% (v/v) *n*-декана и 10мМ ортованадата натрия, или 0,025 мМ парокситина гидрохлорида, или 0,1 мМ фенил-аргинин β-нафтиламид (РАβN) дигидрохлорида в качестве ингибиторов насосов. Растворители и ингибиторы использовали в субингибиторных концентрациях, которые не оказывали индивидуального ингибирующего воздействия на рост родококков. В качестве биотических контролей использовали бактериальные суспензии без добавления ингибиторов и/или *n*-декана, в качестве абиотического контроля – неинкубируемую среду. Инкубирование проводили на орбитальном шейкере при 28°C и 160 об/мин в течение 7 сут, контролируя бактериальный рост путем измерения ОП<sub>600</sub> каждые 6-12 ч.

Определение дыхательной активности родококков в присутствии *n*-декана осуществляли с помощью 6-канального распырометра Micro-Oxymax® (Columbus Instruments) в натрий-фосфатном буфере, среде RS или LB при комнатной температуре при постоянном перемешивании (400 об/мин) в течение 24 ч. Оценивали скорость потребляемого O<sub>2</sub> (мкл/мин) в опытных и контрольных (без внесения *n*-декана) суспензиях.

**Результаты.** По нашим данным, клетки *R. ruber* ИЭГМ 231 сохраняли относительно высокие (63%) показатели жизнеспособности под воздействием *n*-декана. При этом показатель среднеквадратичной шероховатости микрорельефа клеточной поверхности после воздействия *n*-декана увеличивался на 21%, тогда как шероховатость нанорельефа снижалась на 33%. Кроме того, наблюдалось уменьшение длины живых клеток на 0,5 мкм, ширины – на 0,1 мкм, и увеличение отношения площади поверхности к объему (S/V) на 0,5 мкм<sup>-1</sup> по сравнению с контролем (S/V мертвых клеток повышался лишь на 0,1 мкм<sup>-1</sup>). Увеличение микрорельефа и относительной поверхности живых клеток родококков свидетельствует о повышении клеточного контакта с растворителем, тогда как снижение показателя нанорельефа может указывать на воздействие *n*-декана на ультраструктурные компоненты клеточной стенки [3]. Нами также выявлено

52%-ное снижение модуля упругости (Юнга) устойчивых к растворителю клеток по сравнению с контролем.

Установлено, что парокситин и РАβN практически полностью (на 99%) подавляют рост *R. ruber* ИЭГМ 231 в присутствии *n*-декана, что указывает на участие протон- и натрий-зависимых эффлюксных насосов в формировании устойчивости родококков к данному растворителю. Напротив, присутствие в среде ортованадата натрия не оказывало ингибирующего воздействия на бактериальный рост клеток, так как АТФ-зависимые насосы, по видимому, не участвуют в выведении избытка *n*-декана из клеток родококков [2].

Респираторная активность родококков в присутствии *n*-декана достигала максимальных значений после 24 ч инкубирования в минеральной среде RS и богатой среде LB (15 и 65 мкл/мин, соответственно). В то же время, в натрий-фосфатном буфере отмечалось низкое (в среднем 6 мкл/мин) потребление кислорода на протяжении всего эксперимента. Отмеченное повышение дыхательной активности родококков может быть вызвано его метаболической деструкцией оксигеназными ферментами [5]. Таким образом, воздействие *n*-декана на клеточную стенку *R. ruber* приводило к существенным изменениям поверхностной морфологии и наномеханических свойств. Механизмы устойчивости к данному растворителю обусловлены работой протон- и натрий-зависимых эффлюксных насосов и окислительных ферментных систем родококков.

Исследования выполнены в рамках государственного задания 6.1194.2014/К Минобрнауки России.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Schmid A., Dordick J.S., Hauer B., Kiener A., Wubbolts M., Witholt B. Nature 2001, 409 (6817), 258-268.
2. Kongpol A., Kato J., Tajima T., Vangnai A.S. Microbes Environ 2012, 27 (1), 30-35.
3. de Carvahlo C.C.R. Biology of Rhodococcus. Microbiology Monographs 16. Alvares H.M. (ed.). Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2010, 109-131.
4. Ившина И. Б. Микробиология 2012, 5, 551-560.
5. Ившина И. Б., Пшеничнов Р. А., Оборин А. А. Пропанокисляющие родококки. УНЦ АН СССР, Свердловск 1987.

## POSSIBLE MECHANISMS OF *RHODOCOCCUS RUBER* RESISTANCE TO *N*-DECANE

Korshunova I. O.<sup>1</sup>, Rubtsova E. V.<sup>1,2</sup>, Kuyukina M. S.<sup>1,2</sup>, Ivshina I. B.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, RAS;

<sup>2</sup>Perm State University, Perm, Russia

Possible mechanisms of *Rhodococcus ruber* IEGM 231 resistance to *n*-decane were studied. Increasing of surface per volume ratio and microscale roughness of bacterial surface were registered which could result in the higher contact area between rhodococcal cells and organic solvent. In contrast, decreasing of nanoscale roughness and Young modulus were detected. Resistance nodulation cell division (RND) and the multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family efflux pumps could be involved in *Rhodococcus* tolerance to *n*-decane. Respiratory activity of cells increased in presence of the solvent indicated bacterial degradation of *n*-decane.

---

---

## УВЕЛИЧЕНИЕ УРОВНЯ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ СРЕД КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КОАГУЛАЗОНЕГАТИВНЫХ СТАФИЛОКОККОВ ПОД ВЛИЯНИЕМ СОЕДИНЕНИЙ, ЭКСТРАГИРУЕМЫХ ИЗ ПОЛИЭТИЛЕНОВЫХ ГРАНУЛ

Лапицкий А. В., Лемкина Л. М.

Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь, Россия

Обнаружен феномен увеличения уровня антибактериальной активности сред культивирования клинических штаммов коагулазонегативных стафилококков при культивировании их с гранулами полиэтилена марки 103. Установлено, что присутствие гранул в среде культивирования приводит к увеличению максимальной удельной скорости роста штамма *Staphylococcus warneri* IEGM KL-1 практически на 30%, при этом антибактериальная активность супернатантов сред культивирования продуцента увеличивается более чем в 2 раза. Аналогичный эффект наблюдался для 9 из 10 исследованных клинических штаммов коагулазонегативных стафилококков и, по-видимому, обусловлен экстрагируемыми из гранул ПЭ 103 соединениями, стимулирующими биосинтез антибактериальных факторов.

**Ключевые слова:** антибактериальные пептиды, коагулазонегативные стафилококки, лантибиотики, полиэтилен.

**Актуальность и цель работы.** Стремительное увеличение числа бактерий с множественной резистентностью к антибактериальным препаратам вызывает обоснованную тревогу всего научного сообщества [1]. В этой связи, в качестве возможной альтернативы традиционным антибиотикам, могут рассматриваться антибактериальные пептиды, среди которых наибольшее внимание привлекают бактериоцины, продуцируемые бактериями в микробных сообществах для подавления конкурирующих видов [2].

Ранее в Лаборатории биохимии развития микроорганизмов ИЭГМ УрО РАН из супернатантов сред культивирования бактерий *Staphylococcus warneri* IEGM KL-1 был выделен катионный пептид семейства лантибиотиков, обладающий широким спектром антибактериальной активности *in vitro* в отношении грамположительных бактерий. Пептид получен в гомогенном состоянии, охарактеризован и, в соответствии с видовой принадлежностью продуцента, получил название варнерин [3]. Разработанная технология лабораторного по-

лучения варнерина успешно используется для всестороннего изучения его биохимических свойств. Тем не менее, для увеличения масштабов производства этого лантибиотика необходимо поиск методов повышения выхода продукта, в том числе за счет оптимизации ферментационных процессов.

Подход, который может быть использован для увеличения продукции антибактериальных пептидов штаммами-продуцентами, был обнаружен при изучении процессов образования биопленок стафилококков на поверхностях различных полимерных гранул. Оказалось, что при культивировании бактерий *Staphylococcus cohnii* в статических условиях с добавкой гранул одной из исследованных марок (ПЭ 103) происходило значительное увеличение оптической плотности планктонной культуры по сравнению с контролем. В связи с этим было сделано предположение, что данные гранулы могут быть использованы с полезным эффектом при культивировании бактерий, продуцирующих бактериоцины. Это явилось основой для изучения влияния гранул марки ПЭ 103 на рост культур коагулазонегативных стафилококков и уровень продукции ими антибактериальных соединений, в частности, варнерина.

**Материалы и методы.** В качестве объектов исследования использовали 11 штаммов-продуцентов антибактериальных соединений: *Staphylococcus warneri* IEGM KL-1 [4] и 10 штаммов коагулазонегативных стафилококков, выделенных из клинического материала. В качестве индикаторных использовали бактерии клинического штамма *S. cohnii*. Культивирование продуцентов проводили на специальной обогащенной питательной среде (ОПС) [5] в течение 7-8 ч в колбах с отбойниками объемом 250 мл (коэффициент заполнения 0,2) на термостатируемом шейкере Certomat IS («Sartorius», Германия) при 160 об/мин и 37°C. В ряде экспериментов в колбы вносили гранулы ПЭ 103, подвергнутые паровой стерилизации (1 атм, 30 мин). О динамике развития культур судили по изменению оптической плотности OD<sub>600</sub>, измеряемой на спектрофотометре PD-303 («Arel», Япония). Параллельно проводили отбор аликвот культуральных жидкостей, в которых после осаждения клеток на центрифуге 5414R («Eppendorf», Германия) в течение 5 мин (4°C, 16100 g) и стерилизации кипячением на водяной бане (10 мин) определяли антибактериальную активность методом

двукратных разведений в 96-луночных иммунологических планшетах («Медполимер», Россия) в среде LB без KCl, используя в качестве индикаторной культуру *S. cohnii*, содержащую  $1,5 \cdot 10^6$  КОЕ/мл. Результаты оценивали после инкубации планшетов в течение 18-20 ч при 37 °C. За условную единицу антибактериальной активности принимали величину максимального разведения, при котором наблюдалось полное торможение роста бактерий индикаторного штамма. Вытяжки подвижных соединений из гранул ПЭ 103 на основе ОПС готовили в тех же условиях, как и при культивировании продуцентов, с массовым соотношением среды и гранул 5:1 в течение 8 часов, но без добавления инокулума (полученные вытяжки не обладали антибактериальной активностью). После этого среду отделяли от гранул, аккуратно перенося ее в стерильные колбы, и инокулировали культурой штамма-продуцента. В качестве контролей использовали исходную питательную среду и среду, содержащую гранулы.

**Результаты.** Изучение влияния массового соотношения гранул ПЭ 103 и питательной среды на уровень продукции варнерина бактериями *S. warneri* IEGM KL-1 показало, что при их культивировании с добавкой гранул в пропорции 5:1 (среда/гранулы) антибактериальная активность супернатантов достигала максимального уровня после шести часов культивирования и была в 4-8 раз выше, чем в остальных случаях (20:1, 10:1, 4:1). Данное соотношение среды и гранул было использовано для проведения последующих экспериментов.

Для оценки универсальности эффекта гранул ПЭ 103 было протестировано их влияние на рост и продукцию антибактериальных пептидов десятью клиническими штаммами бактерий. Наличие гранул в среде культивирования приводило к увеличению оптической плотности культуры в конце логарифмической фазы роста для разных штаммов на 5-45%, а антибактериальная активность супернатантов, отобранных после 7 часов культивирования, была в 2-16 раз выше по сравнению с контролем. Влияние гранул не проявлялось только при культивировании бактерий одного из исследованных клинических штаммов.

Для выявления в составе гранул растворимых компонентов, способных оказывать влияние на процесс биосинтеза варнерина, были изучены рост и уровень продукции антибакте-

риального пептида штаммом *S. warneri* IEGM KL-1 на вытяжках из гранул ПЭ 103. Максимальная удельная скорость роста на вытяжках была практически на треть выше скорости роста на исходной питательной среде, а антибактериальная активность возрастала в 2 раза по сравнению с контролем. Аналогичный эффект наблюдался и при использовании непосредственно гранул. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что гранулы ПЭ 103 содержат экстрагируемые компоненты, способные оказывать стимулирующее действие на биосинтетическую активность штаммов коагулазонегативных стафилококков, продуцирующих бактериоцины.

Работа поддержана РФФИ (проект 14-04-00687) и Минобрнауки Пермского края (проект МИГ соглашение № С-26/632).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Seong-Cheol P., Yoonkyung P., Kyung-Soo H. Int J Mol Sci 2011, 12 (9), 5971-5992.
2. Vaara M. Curr Opin Pharmacol 2009, 9 (5), 571-576.
3. Коробов В. П., Лемкина Л. М., Полюдова Т. В., Акименко В. К. Микробиология 2010, 79 (2), 228-238.
4. Патент РФ на изобретение № 2200195 от 12.01.2001 г. / В. П. Коробов, Л. М. Лемкина, В. К. Акименко.
5. Патент РФ на изобретение № 2274654 от 20.04.2006 г. / В. П. Коробов, Л. М. Лемкина, В. К. Акименко, Т. В. Полюдова.

### INCREASE IN ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF COAGULASE NEGATIVE STAPHYLOCOCCI CULTURE MEDIA UNDER THE INFLUENCE OF EXTRACTABLES FROM POLYETHYLENE BEADS

Lapitckii A. V., Lemkina L. M.

*Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms UB RAS, Perm, Russia*

Increase in antibacterial activity of cultural media of coagulase negative staphylococcal clinical strains when cultured with the addition of polyethylene 103 beads was discovered. Presence of these beads in culture medium led to the increase in maximal specific growth rate of *Staphylococcus warneri* IEGM KL-1 strain of up to 30%, with supernatant antibacterial activity rising twice or more. Similar effects were observed for 9 out of 10 studied strains of coagulase negative staphylococci and are presumed to be connected with extractables from PE 103 beads able to stimulate antibacterial factors' production.

### ДЕФЕКТЫ ТИОЛОВЫХ РЕДОКС-СИСТЕМ МОДИФИЦИРУЮТ СПОСОБНОСТЬ *ESCHERICHIA COLI* К ФОРМИРОВАНИЮ БИОПЛЕНОК ПРИ РАЗНЫХ РОСТОВЫХ ТЕМПЕРАТУРАХ

Лепехина Е. В., Смирнова Г. В.

*Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь, Россия*

Исследовали способность к биопленкообразованию у бактерий *Escherichia coli*, имеющих делеционные мутации по генам *rpoS*, *relA* и *clpP*, а также генам, кодирующим основные компоненты тиоловых редокс-систем, при холодном и теплом воздействии. Показали, что мутации по компонентам тиоловых редокс-систем существенно модулируют способность к формированию биопленок при всех изученных температурах, что может быть связано с нарушением передачи внутриклеточных сигналов, регулирующих биопленкообразование, в условиях дисульфидного стресса. Подтвержден RpoS-зависимый характер индукции биопленкообразования при низких температурах.

**Ключевые слова:** тиоловые редокс-системы, биопленкообразование, окислительный стресс, дисульфидный стресс.

**Актуальность и цель работы.** Бактерии способны существовать как в планктонной форме, в виде одиночных подвижных клеток, так и в виде биопленок – сообществ закрепленных микробных клеток, погруженных в экстраклеточный матрикс. Бактерии, находящиеся в составе биопленки, становятся устойчивыми ко всем антимикробным факторам, что создает существенные медицинские и технические проблемы. Выбор формы существования бактерий является результатом суммарного действия множественных сигнальных каскадов, регулируемых с участием различных внутриклеточных мессенджеров и транскрипционных факторов [1]. Известно, что целый ряд из этих факторов (RpoS, ArcB, OxyR) может прямо или косвенно регулироваться изменениями редокс-ситуации в клетках. В данной работе мы изучали влияние мутаций в компонентах редокс-систем глутатиона и тиоредоксина на биопленкообразование *Escherichia coli* при разных ростовых температурах.

**Материалы и методы.** Объектом исследования служили бактерии *E. coli* BW25113 (*wt*) и одиночные делеционные мутанты JW2663 ( $\Delta$ *gshA*), JW3467 ( $\Delta$ *gor*), JW0833 ( $\Delta$ *grxA*), JW1051 ( $\Delta$ *grxB*), JW5856 ( $\Delta$ *trxA*), JW0871 ( $\Delta$ *trxB*), JW2755 ( $\Delta$ *relA*), JW0427 ( $\Delta$ *clpP*) и JW5437 ( $\Delta$ *rpoS*) из коллекции Keio, сконструированные в нашей лаборатории методом трансформации плазмид и трансдукции с фагом P1 двойные мутанты NM3655 ( $\Delta$ *gshAtrxA*) и NM3761 ( $\Delta$ *gortrxB*). Бактерии выращивали на минимальной среде M9 с глюкозой (0,15%) при 37°C, затем центрифугировали и ресуспендировали в 5 мл среды M9 (0,4% глюкозы) с добавлением 0,2% казаминовых кислот и тиамин (10 мкг/мл) до значения оптической плотности OD<sub>600</sub> = 0,1. Способность к биопленкообразованию определяли в полистирольных планшетах, в лунки которых стерильно вносили по 100 мкл суспензии бактериальных клеток или среды M9 (контроль), культивировали 110 мин при 37 °C в термостатируемом шейкере ST-32 ELMi, а затем помещали в термостат при разных температурах в диапазоне 20-46°C. Интенсивность биопленкообразования оценивали через 21 ч по степени окрашивания биопленок генциан-виолетом. Подвижность бактерий определяли путем измерения диаметра зоны роста на полужидком агаре (0,3%) через 1 сут. инкубации при 30°C. Экспрессию генов оценивали пу-

тем измерения  $\beta$ -галактозидазной активности в штаммах, несущих генные слияния *katG::lacZ* и *sodA::lacZ* при температурах 20°C, 37°C и 46°C. Полученные данные подвергали статистической обработке.

**Результаты.** Мутации по компонентам тиоловых редокс-систем значительно влияли на подвижность бактерий и способность к биопленкообразованию при оптимальных температурах 30°C и 37°C. Максимальное ингибирование подвижности (от 2 до 6 раз) было характерно для штаммов, несущих мутации *gor*, *grxB*, *trxA*, *gshAtrxA* и *gortrxB*. Эти же штаммы и мутант по *grxA* демонстрировали повышенный уровень биопленкообразования (SBF) от 1,5 до 2,2 раз по сравнению с клетками дикого типа. Таким образом, соблюдалась установленная ранее другими исследователями обратная зависимость между подвижностью бактерий и уровнем биопленкообразования. За исключением делеции по глутатиону, во всех мутантах по компонентам тиоловых редокс-систем, и особенно у двойных мутантов, наблюдалось возрастание экспрессии гена *katG* относительно ее значения в родительском штамме, что является следствием активации регуляторного белка OxyR в условиях дисульфидного стресса, испытываемого этими мутантами. В этих условиях возрастает также экспрессия OxyR-контролируемого гена *oxyS*, кодирующего малую регуляторную РНК OxyS. Индукция OxyS приводит к ингибированию FlhDC регулона, что может объяснить наблюдаемое нами снижение подвижности у мутантных бактерий.

Вероятно, дисульфидный стресс влияет и на активность сенсорной киназы ArcB, которая ингибируется при окислении ее редокс-активных цистеиновых остатков, локализованных в цитоплазме [2]. Под негативным контролем двухкомпонентной системы ArcAB находится малая регуляторная РНК ArcZ, которая способна ингибировать подвижность бактерий, одновременно стимулируя продукцию биопленок за счет активирующего эффекта на центральный регулятор биопленкообразования CsgD. Под негативным контролем ArcAB системы находится также ген *sodA*, кодирующий Mn-супероксиддисмутазу. Мониторинг экспрессии этого гена в мутантах по тиоловым редокс-системам выявил 1,5–2,6-кратное снижение экспрессии *sodA* у бактерий, несущих мутации *grxA*, *grxB*,

*gshAtrxA* и *gortrxB*. Наблюдаемая нами обратная корреляция между экспрессией гена *sodA* и способностью к биопленкообразованию противоречит ArcZ-зависимому механизму стимуляции продукции биопленок в тиоловых мутантах. Следует отметить, что экспрессию *sodA* определяли в планктонной культуре при хороших условиях аэрации.

Ранее было установлено, что наличие RpoS не является обязательным условием для процесса биопленкообразования при оптимальной ростовой температуре [3]. В наших экспериментах при 37°C штамм, лишенный гена *rpoS*, продуцировал в 1,7 раза больше биопленок, чем клетки дикого типа. При этом делеция гена *relA*, кодирующего ppGpp синтетазу, активирующую экспрессию *rpoS*, стимулировала биопленкообразование, а делеция гена *clpP*, кодирующего протеазу RpoS, не влияла на степень продукции биопленок.

Среди факторов окружающей среды, оказывающих влияние на биопленкообразование, важную роль играет температура. Показано, что снижение температуры культивирования до 23°C сопровождается RpoS-зависимой стимуляцией продукции биопленок [3]. В наших экспериментах выращивание бактерий *E. coli* дикого типа в диапазоне от 20–46°C позволило выявить два максимума биопленкообразования при 24°C и 44°C. Повышение продукции биопленок при 24°C отсутствовало в *relA* и *rpoS* мутантах, но сохранялась в штамме с делецией *clpP*, что подтверждает RpoS-зависимый ха-

рактер индукции биопленкообразования при этой температуре. Наличие мутаций по компонентам тиоловых редокс-систем значительно изменяло профиль зависимости продукции биопленок от температуры, что может быть связано с нарушениями в редокс-регуляции путей передачи внутриклеточных сигналов. В частности известно, что RpoS негативно контролируется ArcAB двухкомпонентной системой, а малая регуляторная РНК OxyS оказывает ингибирующий эффект на экспрессию гена *rpoS*. Следовательно, образование S-S связей в регуляторных белках OxyR и ArcB в тиоловых мутантах, испытывающих дисульфидный стресс, должно ингибировать RpoS-зависимое биопленкообразование при низких температурах, что и наблюдалось в наших экспериментах. Полученные в работе данные открывают возможности для модуляции биопленкообразования путем изменения редокс-статуса среды и клеток.

Исследования поддержаны грантами РФФИ № 13-04-00706, 13-04-96039, 14-04-96031.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Mika F., Hengge R. Int J Mol Sci 2013, 14, 4560-4579.
2. Malpica R., Franco B., Rodriguez C., Kwon O., Georgellis D. Proc Natl Acad Sci 2004, 101, 13318–13323.
3. White-Ziegler C.A., Um S., Perez N., Berns A.L., Malhowski A.J., Young S. Microbiology 2008, 154, 148-166.

### THIOL REDOX-SYSTEMS DEFECTS MODIFY BIOFILM FORMATION UNDER DIFFERENT GROWTH TEMPERATURES

Lepekhina E. V., Smirnova G. V.

*Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, UB RAS, Perm, Russia*

Biofilm formation in *rpoS*, *relA*, *clpP* and thiol redox-system mutants of *Escherichia coli* was studied under conditions of cold and heat stresses. It has been shown that the mutations in the components of thiol redox-systems substantially modify the ability of *E. coli* to form biofilms under all temperatures tested. These modulations in biofilm production may be a result of changes in intracellular signal transduction under conditions of disulphide stress. It was confirmed that the induction of biofilm formation under low temperatures is the RpoS-dependent process.



## ТОКСИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ НИТРИЛОВ КАРБОНОВЫХ КИСЛОТ НА КЛЕТКИ БАКТЕРИЙ

Максимова А. В.

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

Методом биотестирования определен токсикологический параметр  $EC_{50}$  для различных нитрилов. Наиболее токсичными оказались бензонитрил и его 4-гидроксипроизводные. Установлены МИК и МБК токсикантов для четырех нитрилутилизующих штаммов. Самым устойчивым к большинству субстратов был *R. ruber* gt1. Тем не менее, отмечена более высокая устойчивость *P. fluorescens* C2 к гербицидам по сравнению с бактериями рода *Rhodococcus*.

**Ключевые слова:** нитрилы, токсичность, биотестирование, токсикологические параметры  $EC_{50}$  и  $LD_{50}$ , МИК, МБК.

**Актуальность и цель работы.** В результате хозяйственной деятельности синтетические нитрилы попадают в окружающую среду с промышленными сточными водами, при разливах нитрильных соединений, вымывании акриламида из полиакрилатных цементирующих компонентов, утечке компонентов лакокрасочных производств, а также накапливаются в почвах в виде гербицидов – хлор-, бром- и йодпроизводных бензонитрила. Таким образом, нитрилы довольно часто являются компонентами антропогенных и природных биогеоценозов. Большое значение для биотехнологического применения микробных сообществ имеет устойчивость бактерий к высоким концентрациям этих соединений в среде.

**Целью** исследования стала оценка токсичности ряда нитрилов для клеток бактерий.

**Материалы и методы.** В работе использовали лабораторные штаммы-деструкторы нитрилов *Rhodococcus ruber* gt1, *Rhodococcus* sp. A0, *R. erythropolis* 84 и *Pseudomonas fluorescens* C2. Оценку токсичности алифатических предельных (ацето-, валеро-, изобутиронитрил), непредельных (акрилонитрил) и ароматических (бензонитрил, 3,5-дибромо-(бромоксинил) и 3,5-дийодо-4-гидроксибензонитрил (иоксинил) растворов нитрилов для бактерий проводили двумя способами. В первом случае применили подход, основанный на изменении биолюминесценции тест-штамма при его кратковременной экспозиции с растворами

токсикантов. Данный метод является стандартизированным и сертифицированным в Европе (ISO 11348–2) [1] и в России (ПНД ФТ 14.1:2:3:4.11-04, ПНД ФТ 16.1:2:3:4.8–04). Использовали лиофилизированные клетки штамма *E. coli* TG1 (pXen7), содержащего полный lux-оперон *Photobacterium luminescens* размером 7 тыс. п.н. (Эколюм-8) [2]. Сенсор добавляли к испытуемым растворам в соотношении 1:1. Биолюминесценцию измеряли на многофункциональном микропланшетном ридере BioTek (США). Индекс токсичности ИТ рассчитывали по формуле  $ИТ = 100 \times (I_0 - I) / I_0$ , где  $I_0$  и  $I$  соответственно интенсивность свечения сенсора «Эколюм» контроля и опыта через 30 мин контакта. Строили график зависимости уровня биолюминесценции от %-ого содержания нитрилов в двойной логарифмической системе координат и определяли принятый в токсикологии параметр  $EC_{50}$  (median effective concentration). Величина  $EC_{50}$  соответствовала концентрации раствора, при которой происходит ингибирование свечения сенсора на 50%. Для сопоставления данных по токсичности использовали показатель  $LD_{50}$  (median lethal dose), указанный в паспортах безопасности нитрилов для крыс ([www.sigma-aldrich.com](http://www.sigma-aldrich.com)).

Во втором случае определяли минимальные ингибирующие (МИК) и бактерицидные (МБК) концентрации нитрилов в микросуспензионном тесте в лунках плоскодонного 96луночного планшета на среде Лурия-Берта-

ни (LB) с токсикантом и культурой одного из исследуемых штаммов до рабочей концентрации  $10^6$  клеток/мл. Учет результатов МБК производили путем посева на LB-агар через 24 ч, МИК оценивали по оптической плотности на планшетном спектрофотометре Tecan infinite M200 (Швейцария) через 48 ч инкубирования.

**Результаты.** Методом биотестирования определена токсичность исследуемых растворов нитрилов. Наименее токсичными оказались алифатические предельные ацето- и изобутиронитрилы,  $EC_{50}$  которых составила  $1048,32 \pm 355,01$  и  $616,19 \pm 63,05$  мМ соответственно. Пятиуглеродный представитель данной группы (валеронитрил) оказывал большее ингибирующее действие на сенсор даже по сравнению с непредельным акрилонитрилом ( $EC_{50}$   $13,09 \pm 3,57$  против  $37,36 \pm 20,55$  мМ). Нужно отметить, что величина  $EC_{50}$  по акрилонитрилу является сильнотоксичной и соответствует 1000 ПДК, установленной для воды. Из рассмотренных нитрилов самыми токсичными были ароматические нитрилы: бензонитрил угнетал биолюминесценцию *E. coli* на 50% при 0,4 мМ, а его бром- и йодсодержащие производные при концентрациях в 5 и 10 раз меньше:  $0,08 \pm 0,05$  и  $0,04 \pm 0,01$  мМ. Интересно, что А. В. Vesela и др. [3] в своей работе показали, что при использовании в качестве биосенсора бактерии *Vibrio fischeri* величина  $EC_{50}$  для бромоксирила и иоксирила составила 14 и 8 нМ соответственно. По-видимому, данный сенсор является более чувствительным к токсикантам, однако в обоих случаях иоксинил оказался более токсичным. При сопоставлении токсикологических параметров  $EC_{50}$  и  $LD_{50}$  оказалось, что для алифатических нитрилов среднелетальная доза была гораздо выше (примерно в 25 раз для акрило- и ацетонитрилов). Ароматические нитрилы проявляют большее ингибирующее действие на сенсорный штамм *E. coli*, чем на крыс при пероральном введении. Так,  $LD_{50}$  по бензонитрилу был больше  $EC_{50}$  в 23,5 раза, а по бром- и иоксирилу – в 7,25 и 8,5 раз.

При определении МИК всех групп нитрилов на клетки нитрилутилизирующих бактерий выявлено, что токсичность напрямую зависела от сложности субстрата: алифатические предельные нитрилы < алифатические непредельные нитрилы < ароматические нитрилы < галогензамещенные ароматические нитрилы

(гербициды). Так, для первых трех групп субстратов МИК были не меньше 15 мМ, а для последней разброс составил 0,01-0,3 мМ. Среди рассмотренных штаммов самым устойчивым к большинству субстратов был *R. ruber* gt1. Отмечено, что разные штаммы родококков могли существенно различаться по устойчивости к нитрилам: МИК бензонитрила для *R. ruber* gt1, *Rhodococcus* sp. A0 и *R. erythropolis* 84 составила 0,06, 0,03 и 0,015 М соответственно. Хотя МИКи ряда нитрилов для *P. fluorescens* C2 были ниже или равны по отношению к родококкам, тем не менее отмечается более высокая устойчивость клеток псевдомонад к бром- и иоксирилу. Нужно отметить, что при использовании сенсора *E. coli* и штаммов *R. ruber* gt1 и *Rhodococcus* sp. A0 относительная токсичность субстратов совпала. Исключение составил валеронитрил, МИК которого оказалась больше, чем акрилонитрила. При использовании *R. erythropolis* 84 и *P. fluorescens* C2 в качестве тесторных штаммов «линейка» токсичности субстратов выглядела иначе.

Бактерицидные концентрации нитрилов были существенно выше (от 0,125 до 4 М и более, для первых трех групп, и от 1,25 до 5 мМ для четвертой), и отличались от МИК в 4 раза (*P. fluorescens* C2, *R. erythropolis* 84 – для изобутиронитрила), 8 раз (в большинстве случаев) и даже в 33 раза (*R. erythropolis* 84 – для акрилонитрила, *Rhodococcus* sp. A0 – для изобутиронитрила). Для гербицидов этот разброс был еще выше. Устойчивость изученных штаммов бактерий к высоким концентрациям нитрилов объясняется тем, что они были выделены из почв на территории предприятий по производству акриламида, где возможны разливы субстрата и продукта.

Таким образом, учитывая, что изученные штаммы показали высокую устойчивость к нитрильным соединениям, микробные сообщества данных культур могут быть использованы в биоремедиации загрязненных нитрилами территорий.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Palma P., et al. Environ Sci Pollut Res Int 2010, 17 (3), 703-716.
2. Данилов В., Зарубина А., Ерошников Г. и др. Вестник Московского университета 2002, 3, 20-24.
3. Vesela A. V., Franc M., Pelantova H. et al. Biodegradation 2010, 21, 761-770.

## TOXIC EFFECT OF NITRILES ON BACTERIAL CELLS

Maksimova A. V.

Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, UB RAS Perm, Russia

Toxicological parameter  $EC_{50}$  was defined for various nitriles by biotesting (toxicologic testing). Benzoinitrile and its 4-hydroxy derivatives proved to be the most toxic. MIC and MBC of toxicants were determined for four nitrile-degrading strains. *R. ruber* gt1 was the most resistant to the majority of substrates. Nevertheless, higher resistance to herbicides was observed for *P. fluorescens* C2 as compared to bacteria of the genus *Rhodococcus*.

**УСТОЙЧИВОСТЬ БИОПЛЕНОК *PSEUDOMONAS FLUORESCENS* C2 И *RHODOCOCCLUS RUBER* GT1 К ТОКСИЧНЫМ СУБСТРАТАМ И ПРОДУКТАМ ГИДРОЛИЗА НИТРИЛОВ**Оленева М. А.<sup>1</sup>, Максимова Ю. Г.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>ФГБОУ ВПО Пермский государственный национальный исследовательский университет; <sup>2</sup>Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь, Россия

Изучено влияние токсичных субстратов и продуктов гидролиза нитрилов (акрилонитрила, акриламида, акриловой кислоты) на жизнеспособность суспензии и биопленок *Rhodococcus ruber* gt1 и *Pseudomonas fluorescens* C2. Методом биолюминесцентного анализа определено общее содержание АТФ в клетках суспензии и биопленок нитрилгидролизующих бактерий после воздействия токсикантов. Показано, что биопленки как *R. ruber* gt1, так и *P. fluorescens* C2 более устойчивы к воздействию высоких концентраций токсичных субстратов и продуктов и обладают большими адаптивными способностями, что выражается в сохранении или возрастании пула АТФ по отношению к контролю.

**Ключевые слова:** биопленка, биокатализатор, нитрилутилизирующие бактерии, биолюминесцентный метод, жизнеспособность.

**Актуальность и цель работы.** По современным данным, более 99% бактериальных популяций в природных экосистемах существуют не в виде свободно плавающих планктонных клеток, а в виде специфически организованных прикрепленных к субстрату биопленок [1].

Биопленки промышленно значимых штаммов микроорганизмов могут рассматриваться как самоиммобилизующиеся и саморегенерируемые биокатализаторы, что особенно актуально в тех случаях, когда субстраты и/или продукты биокатализа отрицательно воздействуют на жизнеспособность клетки [2].

На сегодняшний день изучение биопленок микроорганизмов и их потенциала является одним из перспективных направлений в биотехнологии. Замена свободно культивируемых клеток микроорганизмов в традиционном ми-

кробиологическом производстве на биокатализаторы в виде иммобилизованных бактерий поднимает биотехнологию на качественно новый, существенно более высокий уровень.

**Целью** настоящей работы явилось изучение влияния токсичных субстратов на жизнеспособность суспендированных клеток и биопленок *Rhodococcus ruber* gt1 и *Pseudomonas fluorescens* C2 путем определения уровня внутриклеточного АТФ.

**Материалы и методы.** Культуры бактерий *R. ruber* gt1 и *P. fluorescens* C2 выращивали в 96-луночных полистирольных иммунологических планшетах. Через 4 сут. культивирования от биопленок отделяли жидкую фазу со свободными клетками, биопленки промывали фосфатным буфером, затем в лунки вносили 150 мкл буфера, в который добавляли

возрастающие концентрации раствора акрилонитрила (НАК), акриламида (АА) и акриловой кислоты (АК). После 20 мин экспозиции раствор с биопленок удаляли, а суспензию центрифугировали в планшетах при 3700 об/мин. Супернатант удаляли, биопленки и клеточный осадок инкубировали с 100 мкл ДМСО на льду в течение 15 мин. Пробы замораживали и хранили при  $-18^{\circ}\text{C}$ .

Концентрацию АТФ определяли, используя стандартный набор реактивов (АТФ Bioluminescent Assay Kit, Sigma). Измерение люминесценции проводили на планшетном ридере Tecan infinite M200 pro ("Tecan", Швейцария). Для определения концентрации АТФ в образце строили калибровочный график, используя результаты люминесценции контрольных образцов, содержащих известную концентрацию АТФ.

**Результаты и обсуждение.** Методом биолюминесцентного анализа содержания АТФ в клетках было изучено влияние НАК, АА и АК на клетки четырехсуточной культуры *R. ruber* gt1 и *P. fluorescens* C2, находящиеся в суспензии и в биопленке. Показано, что при 20-минутном воздействии 1,7 М раствора АА на планктонные клетки *R. ruber* gt1 происходит падение содержания АТФ в клетках более чем в половину от контроля, тогда как концентрация АТФ в клетках биопленки достоверно возрастает. Раствор НАК в концентрации 1,3 М не приводит к достоверному снижению содержания АТФ в клетках планктона, тогда как в клетках биопленки оно значительно (более чем в 2 раза) возрастает. Падение содержания АТФ в планктонных клетках при воздействии высоких концентраций АА может быть связано со снижением их жизнеспособности, тогда как возрастание в клетках биопленки может свиде-

тельствовать о большей адаптивной способности, которая проявляется в стрессовом состоянии. При воздействии НАК на клетки следует учитывать, что одновременно начинается его гидролиз, сопровождающийся накоплением АА, таким образом, воздействие становится многофакторным, включающим влияние токсичного субстрата и продукта, а также протекание самой ферментативной реакции. В целом можно сделать вывод, что биопленки *R. ruber* gt1 проявляют большую жизнеспособность в сравнении с планктонными клетками при воздействии токсичных органических веществ.

При воздействии 1,3 М раствора АК происходит резкое падение концентрации АТФ как в клетках планктона, так и в клетках биопленки *P. fluorescens* C2, вероятно, связанное с закислением среды, которое приводит к гибели клеток. НАК в концентрации 1,3 М приводит к 50%-му снижению содержания АТФ в планктонных клетках, тогда как в клетках биопленки оно не изменяется по сравнению с контролем. Следовательно, физиологическое состояние клеток биопленок нитрилутилизующих бактерий существенно отличается от планктонного состояния. Биопленки как *R. ruber* gt1, так и *P. fluorescens* C2 более устойчивы к воздействию высоких концентраций токсичных субстратов и продуктов, и обладают большими адаптивными способностями, чем планктонные клетки.

Работа поддержана программой УМНИК (2013 г, Пермь) и выполнена в рамках государственного задания № 6.2635.2014/К.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Николаев Ю. А., Плакунов В. К. Микробиология 2007, 2, 149-163.
2. Rosche B., Li X. Z., Hauer B., Schmid A., Buehler K. Trends Biotechnol 2009, 27, 636-643.

### RESISTANCE OF *PSEUDOMONAS FLUORESCENS* C2 AND *RHODOCOCCUS RUBER* GT1 BIOFILMS TO TOXIC SUBSTRATES AND PRODUCTS OF NITRILE HYDROLYSIS

Oleneva M. A.<sup>1</sup>, Maksimova Yu. G.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Perm State National Research University; <sup>2</sup>Institute of Ecology and Genetics Microorganisms UB RAS, Perm, Russia

The effect of toxic substrates and products of the nitrile hydrolysis (acrylonitrile, acrylamide, acrylic acid) on the viability of *Rhodococcus ruber* gt1 and *Pseudomonas fluorescens* C2 biofilm and suspension was studied. A total amount of ATP in biofilm and suspension of nitrile hydrolyzing bacterial cells after exposure to toxic agents was determined by bioluminescent assay. It was shown that both *R. ruber* gt1, and *P. fluorescens* C2 biofilms were more resistant to high concentrations of toxic substrates and products and had greater adaptive capacity, resulting in maintaining or increasing the pool of ATP with respect to the control.

## БИОРАЗНООБРАЗИЕ БАКТЕРИЙ ПОДЗОЛИСТЫХ ПОЧВ ПРИКАМЬЯ, ТРАНСФОРМИРУЮЩИХ АРОМАТИЧЕСКИЕ НИТРИЛЫ И АМИДОСОЕДИНЕНИЙ

Луговская Н. П.<sup>2</sup>, Павлова Ю. А.<sup>1,2</sup>, Литасова А. С.<sup>2</sup>,  
Максимов А. Ю.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>ФГБУН Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН;

<sup>2</sup>ФГБОУ ВПО Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

Исследовано биологическое разнообразие почвенных бактерий, способных активно метаболизировать амиды и нитрилы карбоновых кислот. Наибольшее количество гетеротрофных микроорганизмов обнаружено в образцах, отобранных из гумусового дернового горизонта дерново-луговой почвы с повышенным увлажнением. Наибольшим абсолютным количеством амид-трансформирующих бактерий отличались пробы солончака, отобранные в Челябинской области ( $3,11 \times 10^7$  КОЕ), образцы из гумусового переходного горизонта дерново-луговой почвы с повышенным увлажнением.

**Ключевые слова:** биоразнообразие, нитрилы, амиды, почвенные бактерии, таксономический состав.

**Актуальность работы.** Биокатализ является ведущим современным направлением биохимических исследований и практической биотехнологии. На практике реакции биотрансформации используются как в органическом синтезе, для получения различных химических продуктов, так и для биодеградации или детоксикации веществ, загрязняющих окружающую среду. Богатейшим ресурсом для поиска продуцентов ферментов биотрансформации является почвенная микрофлора, особенно ризосферные микроценозы. Ароматические соединения являются сложными субстратами для биотрансформации, что связано с пространственными затруднениями для расщепления ферментами, с ограничениями в растворимости и транспорте субстрата и продуктов биокатализа, а также с токсичностью многих из них [1]. Синтетические ароматические соединения, используются как мономеры и полупродукты для синтеза полимеров и красителей, взрывчатых веществ и компонентов ракетного топлива, а также в качестве детергентов, растворителей, пестицидов, лекарственных веществ [1-3].

**Материалы и методы.** В исследовании использовали образцы характерных почв Перм-

ского края. Для первичного отбора микроорганизмов использовали минеральную среду N, содержащую в качестве селективных субстратов и единственного источника углерода, азота и энергии фенилацетонитрил, манделонитрил, бензонитрил или бензамид в концентрации 10 мМ. Активные изоляты выделяли методами накопительной культуры и прямого посева. Идентификацию бактерий проводили методами полифазной таксономии с использованием диагностических ключей Определителя бактерий Берджи. Активность ферментов метаболизма амидов и нитрилов определяли с помощью газовой хроматографии на приборе GC-10, Shimadzu и ВЭЖХ (LC-10, Shimadzu). ПЦР-анализ проводили с праймерами, специфичными к последовательностям генов амидаз и нитрилгидратаз, приведенным в GenBank. Статистическую обработку данных проводили с использованием компьютерных программ Microsoft Office XP Excel и «Statistica 5».

**Результаты.** Исследовано биологическое разнообразие почвенных бактерий, способных активно метаболизировать ароматические амиды и нитрилы карбоновых кислот. Было проанализировано 11 различных типов

почв таёжной (Прикамье) и степной (Челябинская и Саратовская обл.) зоны России: поверхностно-подзолистая супесчаная, донные речные отложения, дерново-карбонатная, дерново-луговая глеевая почвы, солодь, каштановая почва степной зоны, солончак, грунт с солеотвала, активный ил. Было выделено более 300 изолятов микроорганизмов, обладающих способностью к биотрансформации нитрилов и амидов.

Наибольшее количество гетеротрофных микроорганизмов обнаружено в образцах отобранных из гумусового дернового горизонта (на глубине 5 см) дерново-луговой почвы с повышенным увлажнением ( $2,93 \times 10^{10}$  КОЕ). Много гетеротрофов содержалось также в пробах солончака, отобранных в Челябинской области ( $2,17 \times 10^{10}$  КОЕ) и в пробах грунта в 2 м от солеотвала СКРУ-2 г. Соликамск ( $2,68 \times 10^9$  КОЕ). Очевидно, что это соответствует образцам с наилучшим соотношением питательных веществ, аэрации и увлажнения. Е. В. Даденко и М. А. Репях сообщают, что по обогащенности почв бактериями на МПА солонцы и солончаки относятся к богатым почвам [5].

Бактерии, активно трансформирующие амиды и нитрилы, обнаружены во всех исследованных почвах и донных отложениях в количестве  $10^5$ - $10^7$  КОЕ/г сухой почвы, что составляет от 0,05 до 48,1% (переходный горизонт дерново-луговой почвы с повышенным увлажнением, глубина отбора проб 20 см) от общего числа гетеротрофов.

Наибольшим абсолютным количеством амид-трансформирующих бактерий отличались пробы солончака, отобранные в Челябинской области ( $3,11 \times 10^7$  КОЕ), образцы из гумусового переходного горизонта дерново-луговой почвы с повышенным увлажнением, г. Красномск ( $2,89 \times 10^7$  КОЕ) и пробы грунта в около солеотвала ( $2,32 \times 10^7$  КОЕ), а наибольшее количество нитрил-трансформирующих бактерий обнаружено в последних двух из них ( $3,08 \times 10^7$  и  $7,50 \times 10^7$  КОЕ). В большинстве образцов почв количество амид и нитрилтрансформирующих бактерий было примерно равным или соотносимым. Это свидетельствует в пользу координированного метаболизма нитрилов и амидов в экосистемах. Кроме того, было показано, что до 86% изолятов, трансформирующих амиды были способны к метаболизму и нитрильных соединений. Преобладание амидтрансформи-

рующих бактерий наблюдалось в образцах гумусового горизонта дерново-луговой почвы и солончака, что может быть связано с повышенным увлажнением данных образцов почв, при котором образцы содержат большое количество граммотрицательных бактерий, среди которых распространена способность активно метаболизировать амидосоединения. Однако в относительном выражении образцы солончака, солоди и гумусового горизонта дерново-луговой почвы с повышенным увлажнением показали низкое процентное содержание нитрил- и амидтрансформирующих бактерий.

Фенилацетонитрил-утилизирующие бактерии были представлены во всех типах почв. Наибольшее их количество обнаружено в образцах, отобранных на глубине 5 см дерново-луговой почвы с повышенным увлажнением ( $3,68 \times 10^6$ ), а также в пробах подзолистой супесчаной почвы ( $6,25 \times 10^5$ ). Высокая степень встречаемости бактерий, вероятно, связана с тем, что растения продуцируют многие нитрильные соединения, в том числе и фенилацетонитрил [4]. Наибольшую часть активных изолятов, растущих на простых органоминеральных средах, составляли актинобактерии видов *R. erythropolis* (20%), *R. rhodochrous* (9%), а также рода *Arthrobacter* (2%); среди граммотрицательных бактерий преобладали представители *P. fluorescens* (7%), *P. putida* (8%), а также другие представители рода *Pseudomonas* и бактерии родов *Agrobacterium* – 2% и *Acinetobacter* – 3%.

Работа поддержана проектом Государственного задания на выполнение научно-исследовательской работы № 6.2635.2014/К и грантом РФФИ 13-03-96050 p\_урал\_a.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Нестеров П. В. Итоги науки и техники. Деструкция токсичных органических соединений микроорганизмами. М.: ВИНТИ, 1991, 100 с.
2. Перцович С. И., Гуранда Д. Т., Подчерняев Д. А. и др. Биохимия, 2005, Т. 70, 11, 1556-1565.
3. Хоменков В. Г. Прикл. биохим. микробиол., 2008, 44, 8, 133-152.
4. Howden A. J. M., Preston G. M. Microbial Biotechnol. 2009, 2, 441-451.
5. URL: <http://oren-icn.ru/index.php/enzoren/stepene/129-stepenecat/792-2012-01-25-07-58-20>

**BIODIVERSITY OF BACTERIA OF PODZOLIC SOILS OF PERM REGION,  
TRANSFORMED AROMATIC NITRILES AND AMIDE COMPOUND**Lugovskaya N. P.<sup>2</sup>, Pavlova J. A.<sup>1,2</sup>, Litasova A. S.<sup>2</sup>, Maksimov A. Y.<sup>1</sup><sup>1</sup>Perm State National Research University; <sup>2</sup>Institute of Ecology and Genetics  
of Microorganisms, RAS, Perm, Russia

The biological diversity of amide- and nitrile-metabolizing soil bacteria was investigated. The largest number of heterotrophic microorganisms found in the samples collected from the humus sod horizon sod-meadow soils with high humidity. The largest absolute number of amide-transforming bacteria differed saline samples were selected in the Chelyabinsk region ( $3,11 \times 10^7$  CFU), samples of humus transient horizon sod-meadow soils with high humidity.

**ДЕЙСТВИЕ ЦИПРОФЛОКСАЦИНА НА БАКТЕРИИ  
*ESCHERICHIA COLI*, РАСТУЩИЕ НА РАЗНЫХ  
ИСТОЧНИКАХ УГЛЕРОДА И ЭНЕРГИИ**Петерс М. А.<sup>1</sup>, Музыка Н. Г.<sup>1</sup>, Октябрьский О. Н.<sup>1,2</sup><sup>1</sup>Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН; <sup>2</sup>Пермский национальный  
исследовательский политехнический университет, Пермь, Россия

Изучено влияние различных источников углерода и энергии на скорость продукции экстраклеточного супероксидного радикала и устойчивость бактерий *Escherichia coli* к ципрофлоксацину. Установлена обратная зависимость между метаболической активностью бактерий и их устойчивостью к ципрофлоксацину.

**Ключевые слова:** выживаемость, супероксидный радикал.

**Актуальность и цель работы.** Ципрофлоксацин является высокоэффективным и широко используемым антибиотиком, входящим в группу фторхинолонов. Эти антибиотики ингибируют синтез ДНК путем взаимодействия с бактериальными топоизомеразами – ДНК-гиразой и топоизомеразой IV. Топоизомеразы играют важную роль в процессе репликации, релаксируя сверхспирализованные молекулы ДНК посредством внесения одно- или двучечных разрывов с последующим их восстановлением (лигированием). Хинолоны быстро связываются с комплексом ДНК-фермент, препятствуя восстановлению разрывов в молекуле ДНК, что приводит к фрагментации хромосом и, в конечном итоге, к гибели клеток [1]. Ципрофлоксацин оказывает бактерицидный эффект как в аэробных, так и в анаэробных условиях. Предполагается, что в аэробных условиях в механизм бактерицидного действия хинолонов вовлечены активные формы кислорода (АФК): супероксид, перекись водо-

рода и гидроксильные радикалы, продуцируемые с участием дыхательной цепи [2]. С целью дальнейшего исследования роли АФК в гибели клеток, индуцированной ципрофлоксацином, мы изучали продукцию супероксида и действие этого антибиотика на бактерии *Escherichia coli*, культивируемые на различных источниках углерода и энергии.

**Материалы и методы.** В экспериментах использовали бактерии *E. coli* BW25113 (wt), растущие на минимальной среде M9 с добавлением 10 мМ глюкозы или натриевых солей сукцината, α-кетоглутарата и ацетата. За ростом следили путем измерения оптической плотности при длине волны 600 нм ( $OD_{600}$ ). Клетки из ночной культуры после центрифугирования переносили в 250-мл колбы со 100 мл свежей среды (начальная  $OD_{600}=0,1$ ) и культивировали на шейкере (150 об/мин) при 37°C до  $OD_{600}=0,4$ . При достижении этой плотности в культуру вносили ципрофлоксацин в концентрациях 0,0 (контроль), 0,3 и 3,0 мкг/мл и далее

выращивали в присутствии антибиотика в течение 2 ч. Действие ципрофлоксацина оценивали традиционными методами: по его влиянию на удельную скорость роста ( $\mu$ ) и способность к образованию колоний (КОЕ) на твердом LB агаре. Кроме того, с помощью флуоресцентного микроскопа (Leika DM2000) подсчитывали число живых и мертвых клеток после окрашивания пропидий иодидом и SITO9 ("life/dead" тест), а также определяли способность бактерий поддерживать мембранный потенциал ( $\Delta\psi$ ) по окрашиванию клеток флуоресцентным красителем DIBAC. Измерение внеклеточного супероксидного радикала ( $O_2^-$ ) осуществляли по методу, основанному на способности супероксида восстанавливать цитохром C, добавленный в клеточную суспензию [3].

**Результаты.** В контрольных культурах без добавления антибиотика  $\mu$  зависела от используемого источника углерода и энергии и составляла  $0,63 \pm 0,02$  ч<sup>-1</sup> для глюкозы,  $0,43 \pm 0,01$  ч<sup>-1</sup> для сукцината,  $0,39 \pm 0,01$  ч<sup>-1</sup> для  $\alpha$ -кетоглутарата и  $0,18 \pm 0,01$  ч<sup>-1</sup> для ацетата. Добавление 0,3 мкг/мл ципрофлоксацина после 30-45 мин задержки приводило к постепенному снижению значения  $\mu$ , которое было наиболее выражено в культурах, растущих на глюкозе и сукцинате, где через 2 ч экспозиции с антибиотиком скорость роста падала в 16 и 7 раз, соответственно. При росте на  $\alpha$ -кетоглутарате и ацетате  $\mu$  в этих условиях снижалась в 1,2 и 2,0 раза относительно базового уровня, соответственно. Более высокая доза ципрофлоксацина (3,0 мкг/мл) вызывала резкое ингибирование роста на всех субстратах, и через 1 ч после добавления антибиотика значение  $\mu$  было близким к нулю.

Известно, что бактерицидное действие хинолонов имеет двухфазный характер: при концентрациях выше МИК (минимальная ингибирующая концентрация) летальное действие антибиотика возрастает до концентрации, которую называют оптимальной бактерицидной концентрацией; при дальнейшем повышении дозы антибиотика его бактерицидная активность падает [4]. Этот парадоксальный эффект наблюдался и в наших экспериментах. При росте *E. coli* на всех субстратах низкая концентрация ципрофлоксацина (0,3 мкг/мл) оказывала более выраженный эффект на снижение КОЕ и увеличение числа мертвых клеток в тесте "life/dead", чем высокая доза (3,0 мкг/мл). Зависимость действия ципрофлоксацина от дозы

сильнее проявлялась при росте на сукцинате и  $\alpha$ -кетоглутарате, где через 2 ч экспозиции малая доза антибиотика была в 8 раз эффективнее, чем большая. При росте на глюкозе эффективность малой дозы была в 3,0 раза выше, а при росте на ацетате – в 2,5 раза выше, чем большой. В целом степень летального действия ципрофлоксацина прямо коррелировала с уровнем  $\mu$  культуры в течение периода экспозиции с антибиотиком. Предполагается, что двухфазный характер бактерицидной активности хинолонов связан с ингибированием синтеза РНК при концентрациях, превышающих МИК [4]. Удельная скорость роста является интегральным показателем метаболической активности клеток. Показано, что значение  $\mu$  обратно пропорционально уровню алармона гуанозинтетрафосфата (ppGpp), который регулирует многие метаболические процессы и ответ клеток на различные стрессовые воздействия, в том числе путем торможения синтеза рибосомальной и транспортной РНК. Следовательно, сохранение высокой скорости роста и, соответственно, низкого уровня ppGpp в период экспозиции к ципрофлоксацину должно повышать эффективность бактерицидного действия антибиотика. В противоположность выживаемости (КОЕ и тест "life/dead"), способность клеток поддерживать мембранный потенциал (тест с DIBAC) снижалась с повышением концентрации антибиотика. Это еще раз свидетельствует о том, что бактерии с пониженной метаболической активностью проявляют большую устойчивость к действию ципрофлоксацина.

Дальнейшим подтверждением роли метаболической активности является то, что при обеих концентрациях ципрофлоксацина выживаемость бактерий (КОЕ), растущих на разных энергетических источниках, находится в сильной обратной зависимости от удельной скорости роста в период до добавления антибиотика. Коэффициенты корреляции составляют  $-0,99$  для 0,3 мкг/мл и  $-1,0$  для 3,0 мкг/мл ципрофлоксацина. При этом через 2 ч экспозиции к обеим концентрациям антибиотика КОЕ в культурах, растущих на сукцинате,  $\alpha$ -кетоглутарате и ацетате, было в 8, 11 и 200 раз выше, чем на глюкозе.

Ранее было показано, что ципрофлоксацин и бактериостатический антибиотик хлорамфеникол вызывают повышение уровня супероксида в клетках *E. coli* [5]. В наших экспериментах обработка бактерий, растущих на глюкозе,



3,0 мкг/мл ципрофлоксацина приводила к увеличению скорости продукции супероксида в 1,6 раза по сравнению с базовым значением. При росте на различных энергетических субстратах скорость продукции внеклеточного супероксида составляла в пикомолях на 0,1 OD<sub>600</sub> в мин 4,59±0,36 для глюкозы, 4,30±0,34 для сукцината, 4,48±0,46 для α-кетоглутарата и 2,95±0,40 для ацетата. Таким образом, только в случае ацетата наблюдалось достоверное уменьшение скорости продукции супероксида в 1,55 раза по сравнению с культурой, растущей на глюкозе. Вероятно, что в совокупности с более низкой удельной скоростью роста (в 3,5 раз), снижение продукции супероксида может вносить вклад в высокую устойчивость

бактерий, растущих на ацетате, к бактерицидному действию ципрофлоксацина.

Исследования поддержаны грантами РФФИ № 13-04-00706, 13-04-96039, 14-04-96031.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Drlica K. et al. J Antimicrob Agents Chemother 2008, 52, 385-392.
2. Wang X. et al. J Antimicrob Agents Chemother 2010, 65, 520-524.
3. Korshunov S., Imlay J. A. J Bacteriol 2006, 188, 6326-6334.
4. Lewin C. S., Morrissey I., Smith J. T. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1991, 10, 240-248.
5. Albesa I. et al. Biochem Biophys Res Commun 2004, 317, 605-609.

### EFFECTS OF CIPROFLOXACIN ON *ESCHERICHIA COLI* BACTERIA GROWING ON DIFFERENT SOURCES OF CARBON AND ENERGY

Peters M. A.<sup>1</sup>, Muzyka N. G.<sup>1</sup>, Oktyabrsky O. N.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institute of Ecology and Genetic Microorganisms, RAS; <sup>2</sup>Perm National Research Polytechnic University, Perm, Russia

The action of different carbon and energy sources on the production rate of extracellular superoxide and resistance of *Escherichia coli* bacteria to ciprofloxacin were investigated. An inverse relationship between the metabolic activity of bacteria and their resistance to ciprofloxacin was established.

---

### ОПРЕДЕЛЕНИЕ БИОПЛЕНКООБРАЗУЮЩЕЙ СПОСОБНОСТИ *ACINETOBACTER BAUMANNII*, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ РАЗЛИЧНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Позднякова Н. Л.

ГБОУ ВПО ЮУГМУ кафедра микробиологии, вирусологии, иммунологии и клинической лабораторной диагностики, Челябинск, Россия

Исследована способность к биопленкообразованию у *A. baumannii*, выделенных из различного биологического материала. Данное свойство во многом определяет патогенный и персистентный потенциал микроорганизма. Установлено, что *A. baumannii* образует биопленки во всех тестируемых локализациях, наибольшая способность к образованию внеклеточного матрикса обнаружена у бактерий, выделенных из крови.

Ключевые слова: биопленка, *A. baumannii*, персистентный потенциал.

**Актуальность и цель работы.** *Acinetobacter baumannii* является новым патогеном человека, который вызывает широкий спектр инфекций (например, пневмонии, инфекции мочевыводящих путей, кровотока и кожных

покровов), что составляют около 10% всех внутрибольничных инфекций. С 1980-х годов 3 наиболее эпидемически-опасных штамма *A. baumannii* появились и распространились во многих географических районах. Эти

штаммы характеризуются множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ) [1]. Одним из факторов патогенности *A. baumannii* является способность к образованию биопленок – высокоупорядоченных сообществ бактерий, формирующихся на биологических или искусственных поверхностях в результате адгезии, роста и размножения микроорганизмов и образования полисахаридного внеклеточного матрикса [2]. По данным Центра по контролю заболеваемости США до 80% инфекционной патологии человека может быть связано с формированием биопленок [3].

**Цель исследования** – определить способность *Acinetobacter baumannii*, выделенного из различного биологического материала, к образованию биопленок. Исследования проводились на базе бактериологической лаборатории кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии и клинической лабораторной диагностики ГБОУ ВПО ЮУГМУ.

**Материалы и методы.** Для оценки биопленкообразующей функции использовали *A. baumannii*, выделенный из мокроты, крови и раневого отделяемого пациентов ГБУЗ ЧОКБ.

Для определения биопленкообразующей способности использовались суточные культуры исследуемых микроорганизмов, из которых при помощи комплекта БАК СОП № 1-98 готовили стандартную бактериальную взвесь  $10^8$  КОЕ/мл, доводили до концентрации  $10^6$  КОЕ/мл в мясопептонном бульоне. Полученную суспензию в количестве 100 мкл вносили в лунку стерильного 96-луночного иммунологического планшета. Эксперимент проводили не менее 6 раз. После 24-часовой инкубации при 37 °С содержимое планшета окрашивали фуксином в течение 20 минут. Для экстракции красителя в лунки планшета вносили 96% этиловый спирт. Результаты считывались на микропланшетном фотометре Anthos 2020, при длине волны 492 нм. Количественной оценкой образования биопленки считалось значение оптической плотности экстрагированного красителя.

Статистическая обработка данных проводилась при помощи программы Statistica V.12.0. Результаты представлены в виде среднего значения и стандартного отклонения. Для сравнения данных использовали критерий Mann-Whitney.

**Результаты и обсуждение.** В результате проведенных исследований определили, что *A. baumannii* образует биопленки во всех тестируемых локализациях. Максимальное значение

было обнаружено у *A. baumannii*, выделенных из крови ( $2,073167 \pm 1,328131$ ), менее выраженный внеклеточный матрикс образовывали ацинетобактерии, выделенные из мокроты ( $0,668333 \pm 0,206931$ ), наименьший – из раневого отделяемого ( $0,260667 \pm 0,153935$ ). Достоверность отличий между сравниваемыми группами (p): pP-M=0,0050705; pP-K= 0,0050705; pM-K= 0,045328, где pP-M – достоверность отличий между отделяемым из раны и мокроты, pP-K – раны и крови, pM-K – мокроты и крови.

Частота возникновения ацинетобактерной инфекции возрастает. В Великобритании количество бактериемий, обусловленных *Acinetobacter* spp., с 2002 по 2003 гг. увеличилось на 6% и составило 1087 случаев. Серьезной проблемой для этой страны является значительное повышение частоты бактериемий, вызванных мультирезистентными штаммами *Acinetobacter* spp., – более чем на 300% с 2002 по 2003 гг. (7 и 22 случая соответственно). Эпидемиологические данные свидетельствуют, что биопленки *Acinetobacter* spp. на слизистых оболочках играют определенную роль в таких инфекционных заболеваниях, как пародонтит, инфекции кровотока и инфекции мочевыводящих путей, из-за способности бактерий колонизировать постоянное медицинское оборудование (например, катетеры) [4].

Таким образом, при сравнении биопленкообразующей способности *Acinetobacter baumannii*, выделенного из крови, мокроты и раневого отделяемого пациентов ГБУЗ ЧОКБ, нами установлено, что *A. baumannii* образует биопленки во всех тестируемых локализациях; наибольшая способность к образованию внеклеточного матрикса обнаружена у бактерий, выделенных из крови.

Ацинетобактерии обладают высоким патогенным и персистентным потенциалами, что способствует длительному течению заболевания с возможными осложнениями, вплоть до генерализации процесса.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Antunes L. C.S. et al. PLoS One 2011, 6 (8), 1–10.
2. Aparna M. S., Yadav S. Brazilian Journal of Infectious Diseases 2008, 12 (6), 526–530.
3. Онзуль Е. В., Деулина В. В., Варыгина С. А., Мазурова К. В. Здоровье и образование в XXI веке 2010, 3, 293–294.
4. Гриценко Л. З. и др. Медико-соціальні проблеми сім'ї 2014, 19, 122–127.

## DETERMINATION OF THE ABILITY OF BIOFILM FORMATION OF *ACINETOBACTER BAUMANNII*, ISOLATED FROM THE VARIOUS BIOLOGICAL MATERIALS

Pozdnjakova N. L.

State Budget Educational Institution of Higher Professional Education SUSMU Department of Microbiology, Virology, Immunology and Clinical Laboratory Diagnostics, Chelyabinsk, Russia

Were studied the ability to biofilm formation of *A. baumannii*, isolated from various biological material. This property is largely determines the pathogenicity and persistence potential of this microorganism. It was found that *A. baumannii* biofilm was formed in all localizations' tested with the greatest ability to produce extracellular matrix found in bacteria isolated from the blood.

---

---

## НЕКОТОРЫЕ ОСОБЕННОСТИ БИОПЛЕНОК *MYCOBACTERIUM SMEGMATIS* MC<sup>2</sup> 155

Полюдова Т. В., Жуланова А. Д., Кононова Л. И.,  
Коробов В. П.

Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь, Россия

Исследованы процессы образования биопленок бактериями *Mycobacterium smegmatis* mc<sup>2</sup> 155 при культивировании на разных питательных средах. Показано, что микобактерии формируют особые «плавающие» биопленки. Поверхность таких биопленок обладает значительной гидрофобностью. Обнаружена выраженная зависимость липидного состава биопленок от среды их формирования.

*Ключевые слова:* микобактерии, биопленки, *Mycobacterium smegmatis*.

**Актуальность и цель работы.** В последние годы резко возросла частота возникновения микобактериозов. Возбудителями этих заболеваний являются условно-патогенные нетуберкулезные микобактерии (НТМБ), резистентные ко многим антибактериальным противотуберкулезным препаратам, широкому спектру дезинфектантов и факторам внешней среды. Высокая устойчивость НТМБ к неблагоприятным факторам, во многом, может быть связана со способностью этих бактерий к образованию биопленок, в частности, на границах раздела фаз.

Процессы формирования биопленок *Mycobacterium* основаны на убиквитарности пленочных структур как основной формы существования бактерий в окружающей среде, оппортунизме бактерий биопленок, способных пребывать в организме как бессимптомно, так и вызывать острые и хронические инфекции с наличием в них высокорезистентных

к антибиотикам некультивируемых клеток [1]. Существование клеток в биологических средах «облегчает» межклеточный матрикс, защищающий клеточные элементы от неблагоприятных факторов среды. Погружение в матрикс снижает чувствительность клеточных элементов биопленок локализованных в организмах животных и человека, к факторам их иммунной защиты.

Начальным условием биопленкообразования является непосредственное сближение бактериальных клеток с поверхностью с адгезией их к доступной для дальнейшей колонизации поверхности, что происходит за счет сил гидрофобного и электростатического взаимодействия. Выраженная гидрофобность является одной из значимых характеристик клеточной поверхности микобактерий, которая эффективно реализуется в процессе адгезии и последующем формировании микроколоний и матрикса биопленок [2]. Характерные

биологические особенности микобактерий – наличие в них миколовых кислот, гликополипептидов, экзополисахаридов – определяют их гидрофобность, выраженную сорбционную активность с быстрым прикреплением к гидрофобным пластиковым поверхностям [3] и развитием особых «морщинистых» биопленок на границах раздела фаз [1].

**Целью** данной работы явилось изучение характера формирования биопленок *Mycobacterium smegmatis* mc<sup>2</sup> 155 при культивировании бактерий на разных средах и характеристика некоторых свойств зрелых биопленок.

**Материалы и методы.** Объектом исследований явились бактерии *M. smegmatis* mc<sup>2</sup> 155. Бактерии выращивали на двух средах: синтетической питательной среде Sauton, в состав которой входят (г/л): L-аспарагин – 4, лимонная кислота – 2, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O – 0.65, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O – 0.5, тритон X100–0.05, глицерол – 40 мл, а также жидкой среде, включающей (г/л): дрожжевой экстракт («Oxoid», США) – 10, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 1, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O – 3, Na-лактат (70%) – 40 мл.

Для получения биопленок 20 мл жидких питательных сред вносили в чашки Петри (d=90 мм) и инокулировали суточной культурой *M. smegmatis* mc<sup>2</sup> 155 на среде Sauton в количестве 200 мкл. Культивирование проводили в течение 3 суток при температуре 37 °С без перемешивания.

Гидрофобность поверхностей биопленок оценивали по измерению контактного угла смачивания, нанося на поверхность биопленок капли воды, 0.9% раствора NaCl, 0.5М фосфатного буфера, глицерина. Изучение профиля капель и измерение краевого угла смачивания проводили после фотографической детекции. При величине угла смачивания больше 90° поверхность рассматривали как гидрофобную. Гидрофобность поверхностей бактериальных клеток исследовали с помощью МАН-теста [4]. Экстракцию бактериальных липидов биопленок проводили по методу Блайя и Дайера. Липидный состав экстрактов определяли методом одномерной тонкослойной хроматографии на пластинах «Sorbfil» (Россия) в системах растворителей для полярных липидов хлороформ: метанол: вода (65:25:4, v/v), для неполярных – гексан: этиловый эфир: уксусная кислота (80:20:1, v/v). Идентификацию отдельных липидов проводили окрашиванием специфическими красителями (ацетат меди

использовали для окрашивания общих липидов, α-нафтол – для гликолипидов, реактив Цинцаде – для фосфолипидов, нингидрин – для выявления липидов, содержащих аминокетильную группу), а также по сопоставлению подвижностей (R<sub>F</sub>) маркеров липидов [5].

**Результаты.** При исследовании процессов формирования биопленок бактериями *M. smegmatis* выявлено, что на обеих средах в статических условиях культивирования образуются «плавающие» биопленки, сосредоточенные на границах раздела фаз жидкость/воздух. Наиболее выраженные биопленки формируются на жидкой среде, содержащей лактат натрия. Так, масса сырой биомассы пленок, полученных на среде с лактатом натрия, была в 2 раза выше, чем при росте на среде Sauton (400 мг и 200 мг соответственно).

Изучение поверхностей биопленок, контактирующих с воздушной средой, показало высокий уровень их гидрофобности, так как краевые углы смачивания при нанесении на поверхность капель воды, фосфатного буфера, раствора NaCl или глицерина имели значения 119°±1; 121±1; 117±2; 110±2 соответственно. Планктонные клетки *M. smegmatis* mc<sup>2</sup> 155 обладали также высокой гидрофобностью поверхности, независимо от использованных сред культивирования. По результатам МАН-теста гидрофобность клеток была выше 95%.

При исследовании липидного состава биопленок *M. smegmatis* mc<sup>2</sup> 155, полученных при культивировании бактерий на разных средах в обоих случаях были выявлены неполярные липиды: 1,2-диглицериды, 1,3-диглицериды, в небольшом количестве триглицериды и моноглицериды, содержание которых на среде Sauton было значительно выше. Полярные липиды, выявленные в составе биопленок *M. smegmatis* mc<sup>2</sup> 155, выращенных на обеих средах, представлены фосфолипидами: кардиолипином, фосфатидилэтаноломином, фосфатидилинозитом, который в биопленках со среды Sauton определялся в следовых количествах, и гликолипидом со значением R<sub>F</sub> 0.8. Были также обнаружены фосфатидилинозитолманнозиды – фосфорсодержащие гликолипиды. На среде Sauton дополнительно выявлены фосфатидилсерин и гликолипид с величиной R<sub>F</sub> 0.5, а биопленки, выращенные на лактатсодержащей среде, отличились наличием гликолипида с величиной R<sub>F</sub> 0.85.

Таким образом, бактерии *M. smegmatis* mc<sup>2</sup> 155 формируют гидрофобные биопленки на границе раздела фаз. Наибольшая биомасса пленок формируется на среде, в состав которой входит лактат натрия. Полученные результаты анализа липидных компонентов исследованного штамма микобактерий могут стать основой для разработки методов, препятствующих формированию биопленок, и эффективной деструкции этих сложных и прочных бактериальных структур.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ojha A. K., Baughn A. D., Sambandan D., Thsu T. *Mol Microbiol* 2008, 69 (1), 164-174.
2. Романова Ю. М., Гинцбург А. Л. *Микробиология* 2011, 3, 99-109.
3. Chen J. M., German G. J., Alexander D. C., Ren H., Tan T. et al. *J Bacteriol* 2006, 1, 633-641.
4. Rosenberg M. *FEMS Microbiol Lett* 1980, 9 (1), 29-33.
5. Кейтс М. *Техника липидологии: выделение, анализ и идентификация липидов*. Мир, Москва 1975.

**SOME CHARACTERISTICS  
OF *MICOBACTERIUM SMEGMATIS* MC<sup>2</sup> 155 BIOFILMS**

Poludova T. V., Zhulanova A. D., Kononova L. I., Korobov V. P.

*Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, RAS, Perm, Russia*

The phenomena of biofilm formation by *Mycobacterium smegmatis* mc<sup>2</sup> 155 during the periodic cultivation on different media was analyzed. It is shown that mycobacteria forms special floating biofilms, surface of which are very hydrophobic. Apparent dependence between the lipid content of biofilms and composition of nutrition media used for biofilm formation was found out.

**СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ФОРМИРОВАНИЯ  
БИОПЛЕНОК БАКТЕРИЯМИ *PROPIONIBACTERIUM  
ACNES* AC-1450 НА НАТИВНЫХ И ОБРАБОТАННЫХ  
КАТИОННЫМИ ПЕПТИДАМИ ПОВЕРХНОСТЯХ  
ПОЛИСТИРОЛА**

Полюдова Т. В.<sup>1</sup>, Коробов В. П.<sup>1,2</sup>, Зидина Н. М.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН;

<sup>2</sup>ФГБОУ Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

В работе показана возможность снижения интенсивности формирования биопленок бактериями *P. acnes* Ac 1450 на поверхностях полистирола низкомолекулярными катионными пептидами семейства лантибиотиков. Физическая адсорбция низкомолекулярных пептидов варнерина и хоминина на поверхностях полистирола в течение 24 часов приводит к последующему значительному снижению биомассы суточных пленок *P. acnes* Ac 1450 по сравнению с биомассой пленок сформированных на интактных поверхностях этого полимера.

*Ключевые слова:* биопленки, *Propionibacterium acnes*, варнерин, хоминин.

**Актуальность и цель работы.** Высокий интерес исследователей к бактериям *P. acnes*, являющимся компонентом нормальной микрофлоры, обусловлен их ролью в патогенезе

угревой болезни. Известно, что снижение содержания кислорода в кожных покровах стимулирует развитие этих бактерий, приводящее к разрушению клеток протоков сальных желез,

локальным воспалением и образованию гнойных пустул [1]. В связи с выявленными механизмами развития акне современное лечение основано на применении антибактериальных препаратов. Однако при хроническом течении угревой сыпи длительное использование антибиотиков приводит к формированию устойчивости бактерий *P. acnes* к этим лекарственным средствам, что определяет необходимость поиска альтернативных антибиотикам подходов к подавлению этих возбудителей.

Важно отметить появление данных о роли бактерий *P. acnes* и в имплантат-ассоциированных инфекциях [2]. Однако, механизмы адгезии и формирования биопленок пропионовыми бактериями, а также стратегия оптимальной антибактериальной терапии инфекций, вызванных *P. acnes* и связанных с использованием имплантируемых устройств, до сих пор, практически, не изучены.

**Целью** настоящего исследования явилось изучение чувствительности первых этапов формирования биопленок *P. acnes* Ac 1450 к низкомолекулярным катионным антибактериальным пептидам семейства лантибиотиков варнерину и хоминину.

**Материалы и методы.** В работе использовали бактерии *Propionibacterium acnes* Ac 1450 (ВКМ, Пущино), которые культивировали на жидкой питательной среде, содержащей г/л: дрожжевой экстракт (Sigma) – 10,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 1,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$  – 6, глюкоза – 5, 70%-ый лактат Na – 40 мл.

Биопленки *P. acnes* Ac 1450 формировали на интактных и обработанных пептидами поверхностях полистирола. Предобработку поверхностей проводили внесением в лунки 96-луночных планшетов 100 мкл стерильных растворов пептидов (32 мкг/мл). Планшеты инкубировали в течение 24 ч при 37°C, после чего растворы пептидов удаляли, а лунки дважды осторожно промывали стерильным 0,9% раствором NaCl. В контрольных вариантах экспериментов лунки планшета предобрабатывали по той же процедуре 0,9%-ным раствором NaCl. После этого в лунки планшетов вносили по 100 мкл суспензии бактерий в указанной выше питательной среде, содержащей бактерии в количестве  $\sim 10^6$  КОЕ/мл. Оценку степени развития биопленок осуществляли через 24 ч инкубации при 37°C по интенсивности окрашивания бактериального слоя 0,1% раствором генцианвиолета. С этой целью

в лунки вносили по 100 мкл раствора красителя, инкубировали 15 мин и после удаления раствора генцианвиолета лунки дважды промывали 0,9% раствором NaCl. Для экстракции связавшегося с биопленками красителя использовали 96%-ый этанол, внося его в лунки в количестве 100 мкл. Измерение оптической плотности спиртовых экстрактов осуществляли на планшетном спектрофотометре (Benchmark plus «BioRad») при длине волны 570 нм.

**Результаты.** Ранее нами было показано, что планктонные бактерии *P. acnes* Ac 1450 чувствительны к антибактериальному действию катионных пептидов стафилококков варнерину [3] и хоминину [4]. Минимальная ингибирующая активность для обоих пептидов составляла 32 мкг/мл. В то же время известно, что варнерин и хоминин способны сорбироваться на поверхности полистирола и, тем самым, подавлять адгезию и формирование биопленок коагулазонегативных стафилококков [5]. Как следует из полученных в настоящем исследовании данных, предобработка поверхностей полистирола растворами обоих антибактериальных пептидов приводит к значительному снижению биомассы сформированных в течение 24 ч биопленок *P. acnes* Ac 1450; так, в присутствии пептидов биомасса пленок в обоих случаях снижалась в 3 раза по сравнению с контролем, когда бактерии развивались на интактных, не обработанных пептидами планшетах.

Полученные результаты позволяют предполагать, что торможение развития биопленок бактерий *P. acnes* Ac 1450 связано с бактерицидным действием изучаемых антибактериальных пептидов, иммобилизованных на полистироле за счет первоначальных электростатических и гидрофобных взаимодействий. Взаимодействие катионных пептидов с бактериальными клетками осуществляется благодаря бактерицидному действию этих факторов, приводящему к значительному торможению формирования биопленок пропионовых бактерий.

Таким образом, низкомолекулярные катионные пептиды варнерин и хоминин обладают выраженной, подавляющей образование биопленок, активностью в отношении не только близкородственных продуцентам бактерий [5], но и бактерий филогенетически отдаленного рода *P. acnes*.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Harder J., Tsuruta D., Murakami M., Kurokawa I. *Exp Dermatol* 2013, 22 (6), 386-391.
2. Jahns A. C., Lundskog B., Ganceviciene R., Palmer R. H., Golovleva I. et al. *Brit J Dermatology* 2012, 167 (1), 50-58.
3. Коробов В. П., Лемкина Л. М., Полюдова Т. В., Акименко В. К. *Микробиология* 2010, 2, 228-238.
4. Коробов В. П., Лемкина Л. М., Полюдова Т. В. Патент РФ № 2274654
5. Eroshenko D. V., Korobov V. P. *Multidisciplinary approach for studying and combating microbial pathogens*. BrownWalker Press, 2015, 98-102.

**COMPARATIVE ANALYSIS OF *PROPIONIBACTERIUM ACNES* AC 1450 BIOFILM FORMATION ON NATIVE AND CATIONIC PEPTIDE-TREATED POLYSTYRENE SURFACES**

Polyudova T. V.<sup>1</sup>, Korobov V. P.<sup>1,2</sup>, Zidina N. M.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms UB RAS;* <sup>2</sup>*Perm State National Research University, Perm, Russia*

The paper shows the possibility of low molecular weight cationic peptides of lantibiotic family to reduce the intensity of *P. acnes* Ac 1450 biofilm formation on the polystyrene surfaces. Physical adsorption of low molecular weight peptides, warnerin and hominin, on the polystyrene surfaces during 24 hours leads to a further significant reduction in biomass of *P. acnes* Ac 1450 daily films compared with biomass of intact films formed on the polymer surfaces.

**ОБРАЗОВАНИЕ БИОПЛЕНКОВ КИШЕЧНЫМИ БАКТЕРИЯМИ В ПРИСУТСТВИЕ ПОЛИФЕНОЛСОДЕРЖАЩИХ ЭКСТРАКТОВ ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ**

Самойлова З. Ю., Смирнова Г. В.

ФГБУН Институт экологии и генетики микроорганизмов  
Уральского отделения РАН, Пермь, Россия

Исследовано влияние зеленого и черного чая, а также экстрактов 16 лекарственных растений на биопленкообразование бактерий *Escherichia coli*. У экстрактов зеленого, черного чая, толокнянки и брусники выявлены наиболее мощные модулирующие эффекты на биопленкообразование, связанные с содержанием полифенолов и прооксидантными свойствами испытуемых экстрактов.

*Ключевые слова:* *Escherichia coli*, полифенолы, экстракты растений, антиоксиданты, окислительный стресс.

**Актуальность и цель работы.** Совокупная микрофлора кишечника человека и животных рассматривается как особый физиологический орган, деятельность которого вносит важный вклад в поддержание здоровья макроорганизма. Перспективным направлением является изучение факторов, повышающих биопленкообразование представителями полезной микрофлоры, с одной стороны, и препятствующих формированию БП болезнетворными

бактериями, с другой. Одним из факторов, влияющих на активность микрофлоры, населяющей желудочно-кишечный тракт (ЖКТ), является состав потребляемой пищи. Особый интерес представляют полифенолсодержащие субстраты (овощи, фрукты, экстракты лекарственных растений) (ПФ). ПФ представляют собой обширный класс вторичных метаболитов растений, обладающих антиоксидантной активностью (АОА). Предполагается, что

в этом качестве ПФ, поступающие в организм, участвуют в предотвращении патологий, связанных прямо или косвенно с окислительным стрессом (сердечно-сосудистые заболевания, канцерогенез, воспалительные процессы).

В последние годы происходит существенный пересмотр взглядов на механизм действия ПФ в организме человека и животных. Применение современных высокочувствительных методов показало, что концентрации ПФ в большинстве органов человека слишком малы, чтобы оказывать прямое антиоксидантное действие. На основании этих данных было выдвинуто предположение о том, что основной сайт антиоксидантного действия ПФ находится в желудочно-кишечном тракте (ЖКТ), где концентрация полифенолов может быть достаточно высокой для защиты клеток эпителия и кишечной микрофлоры от активных форм кислорода (АФК). Благоприятные для здоровья эффекты, наблюдаемые при низких концентрациях ПФ в других органах, связывают с их воздействием на регуляторные каскады.

В результате переваривания пищи в кишечнике, происходит непрерывное изменение параметров среды (сдвиги pH, изменение состава питательных субстратов, образование токсичных веществ, в том числе, АФК).

В определенных условиях это может создавать стрессовые условия для жизнедеятельности кишечных бактерий. Известно, что одним из способов адаптации бактерий к стрессам является образование биопленок. Вопрос о влиянии растительных субстратов, в первую очередь полифенолов, на образование и функционирование биопленок кишечными бактериями при стрессах остается малоизученным.

Целью данной работы явилось изучение влияния экстрактов растений, широко используемых в народной и официальной медицине, на образование биопленок бактериями *Escherichia coli*.

**Материалы и методы.** Объектом исследования являлись штаммы *E. coli* BW25113 (родительский тип) и NM3041 (*rpoS::lacZ*). Ночные культуры бактерий *E. coli* выращивали аэробно на минимальной среде M9 с добавлением 2 г/л глюкозы. После центрифугирования клетки из ночной культуры ресуспендировали в свежей среде M9 с добавлением 4 г/л глюкозы, 0,2% казаминовых кислот и тиамина (10 мкг/мл) до значения оптической плотности при 600 нм и культивировали в 96-луночных

полистироловых планшетах в течение 22 ч, необходимых для образования биопленок в присутствии экстрактов. Действующая доза экстрактов во всех экспериментах составляла 0,83 мг сухого вещества на 1 мл.

Водные экстракты были приготовлены из коммерческих фармпрепаратов (ОАО «Красногорсклексредства», «Иван-чай»), зеленый и черный чай – из препаратов Greenfield “Golden Ceylon”.

Влияние экстрактов на биопленкообразующую способность оценивали по методу [1]. Также определяли радикал-связывающую активность (РСА) [2], металл-хелатирующую способность (МХС) экстрактов *in vitro* [3], продукцию пероксида экстрактами [4], а также содержание полифенолов в испытуемых экстрактах [5].

**Результаты.** Выявлено достоверное повышение удельного биопленкообразования бактериями *E. coli* BW25113 при обработке экстрактами брусники, липы, толокнянки и черного чая в 2-3 раза по сравнению с клетками, необработанными экстрактами.

Обработка бактериальных клеток экстрактами из частей березы, кукурузы, чаги и пуштырника способствовала достоверному увеличению удельного биопленкообразования в 1,3-1,8 раза. В этих же условиях обработка клеток бактерий экстрактами крапивы и ламинарии оказывала противоположный эффект и приводила к достоверному снижению удельного биопленкообразования в 1,4 и 1,2 раза, соответственно, по сравнению с клетками, необработанными экстрактами. Результаты экспериментов по определению РСА и МХС активности *in vitro* и измерению скорости продукции пероксида свидетельствуют о наличии редокс-активности у испытуемых экстрактов. Установлено, что наибольшей РСА *in vitro* обладали экстракты черного и зеленого чая, а также экстракты толокнянки, брусники и душицы, наименьшей – хвоща и ламинарии. Наибольшей МХС обладали экстракты зеленого и черного чая, а также череды, толокнянки и березы, наименьшей – экстракты подорожника, эхинацеи и брусники. Обнаружено, что среди испытуемых экстрактов с наибольшей скоростью продуцировали пероксид экстракты черного и зеленого чая, толокнянки и брусники, с наименьшей – экстракты ламинарии, эхинацеи и ноготков. Выявлена корреляция между содержанием в испытуемых экстрактах полифенолов



и их РСА активностью, а также способностью продуцировать пероксид ( $r = +0,97$  и  $r = +0,89$ , соответственно). Корреляционный анализ указывает на наличие связей между удельным биопленкообразованием в обработанных экстрактах культурах и способностью экстрактов продуцировать пероксид ( $r = +0,89$ ), а также содержанием полифенолов в испытуемых экстрактах ( $r = +0,73$ ). Выявлена обратная корреляция ( $r = -0,80$ ), между содержанием полифенолов в испытуемых экстрактах и влиянием на экспрессию гена, одной из функций которого является регуляция процесса биопленкообразования в клетках *E. coli*.

Полученные результаты свидетельствуют о способности полифенолсодержащих экс-

трактов лекарственных растений модулировать биопленкообразование кишечных бактерий.

Работа поддержана грантом РФФИ-Урал № 14-04-96031.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Naves P., del Prado G., Huelves L., Gracia M., Ruiz V. et al. J Appl Microbiol 2008, 105, 585-590.
2. Shyur L.- F., Tsung J.- H., Chen J.- H., Chiu C.- Y., Lo C.- P. Int J Appl Sci Eng 2005, 3, 195-202.
3. Kim H.- J., Chen F., Wang X., Chung H. Y., Jin Z. J Agric Food Chemistry 2005, 53, 7691-7695.
4. Seaver L. C., Imlay J. A. J Bacteriol 2001, 183, 7173-7181.
5. Wu L.- C., Hsu H.- W., Chen Y.- C., Chin C.- C., Lin Y.- I. et al. Food Chem 2006, 95, 319-327.

### BIOFILM FORMATION BY ENTERIC BACTERIA UNDER TREATMENT WITH POLYPHENOL-CONTAINING MEDICINAL PLANT EXTRACTS

Samoilova Z. Y., Smirnova G. V.

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

Biofilm formation by bacteria *Escherichia coli* in the presence of the green and black tea and the extracts of 16 medicinal plants were investigated. The extracts of *Camellia silensis*, *Arctostaphylos uva-ursi* and *Vaccinium vitis-idaea* demonstrated remarkable modulating effects on bacterial ability to form biofilms. The modulating ability correlated with the extracts' polyphenol content and their prooxidant properties.

### СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МЕТОДОВ ВЫЯВЛЕНИЯ ЭКЗОТОКСИНА А *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

Солдатенкова А. В., Калошин А. А., Борисова О. В.,  
Михайлова Н. А., Свиридов В. В.

*ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова, Москва, Россия*

Разработаны ИФА и ПЦР методы для определения экзотоксина А (ЭТА) *Pseudomonas aeruginosa*, позволяющие, с одной стороны, идентифицировать возбудитель, поскольку ЭТА является видоспецифичным, а с другой стороны, определить токсигенность штамма. В данных тестах оценены клинические изоляты *P. aeruginosa*. Определено, что 89% штаммов содержали нуклеотидную последовательность гена ЭТА по данным ПЦР, однако только около 80% клинических изолятов продуцировали ЭТА *in vitro*. Дополнительно оценена цитотоксичность клинических изолятов. Показано, что способность продуцировать ЭТА клиническими изолятами не всегда определяется наличием гена ЭТА в ПЦР.

*Ключевые слова:* *Pseudomonas aeruginosa*, экзотоксин А, ИФА, ПЦР.

**Актуальность и цель работы.** Известно, что возбудителей гнойно-воспалительных заболеваний человека [1], который обладает множе-

ством факторов патогенности, среди которых, липополисахариды, полисахаридная слизь и разнообразные секретирующиеся белки.

Экзотоксин А (ЭТА) является одним из наиболее токсичных секретирующихся факторов патогенности *P. aeruginosa*. ЭТА относится к семейству АДФ-рибозилтрансфераз и вызывает гибель широкого спектра клеток млекопитающих за счёт ингибирования белкового синтеза [2]. В ФГБНУ «НИИВС им. И. И. Мечникова» получены рекомбинантный экзотоксин А, его делеционные формы, не обладающие токсичностью, но способные индуцировать специфический иммунный ответ [3], а также моноклональные антитела, распознающие различные эпитопы ЭТА.

Выявление уровня продукции ЭТА имеет значение в клинике для выявления токсигенных штаммов *P. aeruginosa*, а также при контроле технологического этапа культивирования производственного штамма в процессе получения препарата для профилактики и терапии синегнойной инфекции.

**Материалы и методы.** Культивирование *P. aeruginosa* проводили на питательных средах «ФБУН ГНЦ ПМБ» (МПБ, ПБ, ГРМ 8) и ФГУП «ПИПВЭ им. М. П. Чумакова» (RPMI 1640 с 5% содержанием сыворотки плода коровы (СПК) «ПанЭко») в пробирках объёмом 5 мл при температуре 32 °С в шейкере-инкубаторе со скоростью вращения 200 об/мин в течение 24 ч.

Для постановки цитотоксического теста в лунки стерильного 96-луночного планшета вносили культуральную жидкость *P. aeruginosa*, а затем клетки линии СНО в дозе  $10^4$  клеток на лунку. Для оценки нейтрализации цитотоксичности в лунки дополнительно вносили токсиннейтрализующие моноклональные антитела. Реакцию оценивали в течение 5 дней под инвертированным микроскопом.

Количественная оценка токсигенности штаммов *in vitro* проводилась твердофазным иммуноферментным двухстадийным сэндвич-методом. Для этого на поверхности лунок планшета «Costar» адсорбировали поликлональные антитела к экзотоксину *P. aeruginosa*. На первой стадии в лунки планшета вносили образцы культуральной жидкости *P. aeruginosa*. На второй стадии вносили антитела к ЭТА, меченые пероксидазой. При окрашивании использовали субстратный раствор на основе тетраметилбензидина. Останавливали реакцию 1 М серной кислотой.

Выделение геномной ДНК осуществляли с помощью набора «GeneJET Genomic DNA Purification Kit» (Fermentas). Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили в амплификаторе «Palm Cycler Corbett Research», подобрав оптимальные условия для 35-ти циклов ПЦР: 95 °С – 30 сек (денатурация), 69 °С – 30 сек (отжиг праймеров), 72 °С – 30 сек (элонгация). Анализ ПЦР-продуктов, осуществляли в приборе для капиллярного электрофореза «QIAxel Advanced» (QIAGEN).

**Результаты.** Так как токсинообразование *P. aeruginosa* зависит от условий окружающей среды, при разработке теста на первом этапе были определены оптимальные условия культивирования *P. aeruginosa* на разных питательных средах для синтеза ЭТА. Для этого использовали музейный штамм РА 103. Цитотоксичность культуральных жидкостей оценивали на культуре клеток СНО. Наибольшую цитотоксичность наблюдали при культивировании на среде RPMI 1640 с содержанием СПК 5%. Используя подобранную среду, провели культивирование 94 клинических изолятов *P. aeruginosa*, полученных из бактериологических лабораторий «ГКБ им. И. В. Давыдовского ДЗМ» и «НИИ СП им. Н. В. Склифосовского ДЗМ» в период с мая по декабрь 2013 г. Цитотоксичность культуральных жидкостей клинических изолятов также оценена на культуре клеток СНО. Для подтверждения того, что цитотоксичность в данном случае вызвана экзотоксином А, проведена реакция нейтрализации цитотоксичности. В 50% случаев обнаружено улучшение состояния клеток, по сравнению с лунками, не содержащими токсиннейтрализующих моноклональных антител.

С целью количественного определения ЭТА в культуральных жидкостях разработан и оптимизирован твердофазный иммуноферментный сэндвич-метод. В качестве иммобилизованных и детектирующих (меченых) антител исследованы различные варианты моноклональных и поликлональных антител. Оптимальным оказался вариант с сорбированными на планшете поликлональными антитоксическими антителами и конъюгатом токсиннейтрализующего моноклонального антитела № 33 с пероксидазой хрена. Определено, что более 80% клинических изолятов продуцировали ЭТА *in vitro*.

Наличие гена, кодирующего ЭТА (*toxA*), оценивали с помощью ПЦР. С целью подбора

праймеров для ПЦР провели сравнение в программе OMIGA<sup>2.0</sup> (<http://www.highbeam.com/doc/1G1-61963309.html>) всех полноразмерных последовательностей гена *toxA* *P. aeruginosa*, опубликованных в базе данных GenBank. После определения консервативных участков выбрана оптимальная пара праймеров. Прямой праймер (5'-AGG ACC AGG AAC CCG ACG C) соответствовал 1523-1541 нуклеотидам гена *toxA* *P. aeruginosa* штамма PA103, депонированного в базе данных GenBank (Accession: JARI01000066.1). Обратный праймер (5'-TGA TCG CCT GTT CCT TGT CG) был комплементарен 1839-1858 нуклеотидам той же нуклеотидной последовательности. Расчетный размер детектируемого ПЦР-продукта составлял 336 нуклеотидных пар. Среди 94 изолятов 89% штаммов содержали нуклеотидную последовательность гена ЭТА по данным ПЦР, тогда как у 11% искомая последовательность отсутствовала.

Таким образом разработаны ИФА и ПЦР методы для определения экзотоксина А (ЭТА) *Pseudomonas aeruginosa*, позволяющие, с одной стороны, идентифицировать возбудитель, поскольку ЭТА является видоспецифичным, а с другой стороны, определить токсигенность штамма.

При сравнении методов выявления ЭТА установлено, что в ряде случаев цитотоксичность культуральных жидкостей не совпадала с количеством ЭТА, определённым в ИФА. Данный факт, вероятно, связан с наличием в культуральных жидкостях других секретирующихся факторов патогенности *P. aeruginosa*. В реакции нейтрализации цитотоксичности только в 50% случаев наблюдали улучшение состояния клеток СНО, тогда как в иммуноферментном методе показано, что более 80% изолятов продуцировали ЭТА *in vitro*, что, вероятно, связано с большей чувствительностью метода. Также обнаружено, что 11 клинических изолятов, содержащих нуклеотидную последовательность ЭТА в ПЦР не синтезировали его *in vitro*.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Driscoll J. A., Brody S. L., Kollef M. H. *Drugs* 2007, 67, 3, 351-368.
2. Wolf P., Elsässer-Beile U. *Int J Med Microbiol* 2009, 299, 3, 161-176.
3. Калошин А. А., Исаков М. А., Михайлова Н. А., Вертиев Ю. В. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины* 2012, 154, 9, 330-335.

### COMPARATIVE CHARACTERIZATION OF METHODS FOR IDENTIFICATION OF *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* EXOTOXIN A

Soldatenkova A. V., Kaloshin A. A., Borisova O. V.,  
Michailova N. A., Sviridov V. V.

*I. I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia*

PCR and ELISA methods for the detection of Exotoxin A (ETA) have been developed. On the one hand, these tests can identify the pathogen because of species-specific exotoxin A and on the other hand, the toxigenic strains *Pseudomonas aeruginosa* could be determined. Ninety four clinical isolates were tested. It was determined that 89% of strains contained the nucleotide sequence of gene ETA according to PCR but only about 80% clinical isolates produced ETA *in vitro*. In addition, the cytotoxicity of clinical isolates was estimated. It was shown that the ability to produce ETA by the clinical isolates was not always determined by the existence of nucleotide sequence of ETA gene in PCR.

## РОЛЬ ГЛУТАТИОНА В ЗАЩИТЕ ПЕРИПЛАЗМЫ *ESCHERICHIA COLI* ОТ ЭНДОГЕННОГО СУПЕРОКСИДА ПРИ ПЕРЕХОДЕ ОТ АЭРОБНЫХ К МИКРОАЭРОБНЫМ УСЛОВИЯМ РОСТА

Тюленев А. В.<sup>1</sup>, Смирнова Г. В.<sup>1</sup>, Октябрьский О. Н.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН; <sup>2</sup>Пермский национальный исследовательский политехнический университет, Пермь, Россия

Ранее авторы показали, что в аэробных культурах бактерий *E. coli* наблюдается турновер глутатиона (GSH) между клетками и средой. Остается открытым вопрос о роли этого процесса в физиологии бактериальной клетки. Представлены доказательства, что важной функцией циркуляции GSH может быть защита периплазмы от эндогенного супероксида при переходе от аэробных к микроаэробным условиям роста. Этот процесс находится под контролем двух регуляторных систем ArcAB и RpoS.

**Ключевые слова:** *Escherichia coli*, глутатион, супероксидный радикал.

**Актуальность и цель работы.** Ранее мы показали, что в аэробных культурах *E. coli* глутатион (GSH) непрерывно циркулирует между клетками и средой [1]. Турновер GSH изменяется при стрессах, а его выход прекращается в анаэробных условиях, при ингибировании дыхания и при исчерпании глюкозы. При дыхании происходит непрерывная продукция активных форм кислорода (АФК), таких как супероксидный радикал ( $O_2^{\cdot-}$ ) и перекись водорода ( $H_2O_2$ ). Установлено, что у *E. coli*  $O_2^{\cdot-}$  продуцируется как в цитоплазме, так и в периплазме и может вызывать окислительный стресс в этом компартменте клетки [2]. Для защиты периплазмы от повреждающего действия  $O_2^{\cdot-}$  *E. coli* обладают периплазматической супероксиддисмутазой (Cu, ZnSOD, SodC). Экспрессия гена *sodC* находится под контролем RpoS и индуцируется только в стационарной фазе. Мы предположили, что при экспоненциальном росте существенную роль в защите от периплазматических АФК играет GSH, выходящий в периплазму в процессе трансмембранной циркуляции.

**Целью работы** было изучение связи между турновером GSH и продукцией периплазматического  $O_2^{\cdot-}$  при переходе от аэробных к микроаэробным условиям и роли системы ArcAB, контролирующей этот переход [3].

**Материалы и методы.** Объектом исследования служили бактерии *E. coli* BW25113 (wt)

и мутанты JW2663 ( $\Delta gshA$ ), JW1638 ( $\Delta sodC$ ), JW3467 ( $\Delta gor$ ), JW3901 ( $\Delta menA$ ), JW4364 ( $\Delta arcA$ ), JW5536 ( $\Delta arcB$ ) и JW5437 ( $\Delta rpoS$ ), AN2343 (*cydD1*). Бактерии выращивали на минимальной среде M9 с глюкозой (0.15%) при 37°C в колбах на качалках при 150 об/мин. Парциальное давление кислорода ( $pO_2$ ), восстановленный (GSH) и окисленный глутатион (GSSG), внеклеточный супероксид ( $O_2^{\cdot-}$ ) и  $H_2O_2$  определяли как описано ранее [1]. Экспрессию генов оценивали по активности  $\beta$ -галактозидазы в штаммах со слияниями *rpoS::lacZ*, *sodA::lacZ*. Устойчивость к  $H_2O_2$  определяли, используя чашки с LB-агаром [4].

**Результаты.** В наших условиях рост *E. coli* wt от  $OD_{600}$  0.1 до 0.75 сопровождался снижением  $pO_2$  со 100% до 10%, тогда как удельная скорость роста ( $\mu$ ) оставалась постоянной и равной  $\mu_{max} = 0.72$  час<sup>-1</sup>. При достижении  $pO_2$  около 5% значение  $\mu$  снижалось до 0.51, при дальнейшем росте  $pO_2$  падало до нуля, то есть весь поступающий кислород потреблялся клетками. Ингибирование роста сопровождалось возрастанием экспрессии *rpoS::lacZ* в клетках дикого типа и *gshA* мутанте в 1.5 раза. Экспрессия *sodA*, кодирующего цитоплазматическую MnSOD, снижалась параллельно с изменением  $pO_2$ , причем при лимитации кислородом экспрессия *sodA::lacZ* в мутантах *gshA* поддерживалась на более высоком уровне, чем в BW25113. Скорость продукции экс-

траклеточного  $O_2^-$  после снижения  $pO_2$  до 10% падала у родителя и возрастала у мутантов. Т.о., снижение  $pO_2$  до лимитирующего уровня сопровождалось падением  $\mu$ , повышением экспрессии *rpoS* и повышением продукции  $O_2^-$  у мутантов *gshA* и *sodC*.

В процессе роста внутриклеточный GSH возрастал у всех штаммов, у мутантов *rpoS*, *menA*, *arcA* и *arcB* это возрастание было выражено в большей степени, чем у родителя. Скорость аккумуляции экстраклеточного глутатиона ( $GSH_{out}$ ) у мутантов *sodC* и *rpoS* (контролирует экспрессию *sodC*) была в 1.5 раза выше, чем у клеток дикого типа. Наибольший уровень  $GSH_{out}$  наблюдался у мутантов по глутатионредуктазе (*gor*).

Наши эксперименты показали, что в бесклеточной системе при физиологических уровнях GSH (до 2 мкМ), GSH реагирует с  $O_2^-$  с образованием GSSG и  $H_2O_2$ . При более высоких концентрациях наблюдалось снижение накопления  $H_2O_2$  за счет ее реакции с GSH. В процессе роста мутанты *sodC* и *rpoS* накапливали больше экстраклеточного GSSG и  $H_2O_2$ . Напротив, мутанты *gshA*, имели пониженный уровень  $H_2O_2$  в среде, который начинал возрастать только при достижении  $OD_{600}$  0.8, когда увеличивалась экспрессия *rpoS*. Наибольший уровень  $GSSG_{out}$  наблюдался у мутанта *gor*. Накопление  $GSSG_{out}$  у этого штамма осуществлялось в течение всей периодики и могло быть как результатом окисления GSH в периплазме, так и следствием выхода GSSG из цитоплазмы. В целом, полученные данные указывают на участие GSH в защите от  $O_2^-$  в периплазме.

Ранее показано, что  $O_2^-$  вызывает повреждение неидентифицированных мишеней в периплазме, которые усиливают чувствительность *E. coli* к последующей обработке  $H_2O_2$  [4]. Обнаружено, что в диапазоне значений  $pO_2$  от 30% до 5% наблюдается снижение выживаемости бактерий, подвергнутых воздействию  $H_2O_2$ , более выраженное в *sodC* мутантах и особенно у мутантов *gshA*. Устойчивость к  $H_2O_2$  восстанавливалась, когда значение  $pO_2$  снижалось до нуля и культура адаптировалась к микроаэробным условиям роста. Эти данные являются еще одним свидетельством в пользу участия циркуляции GSH в защите от АФК в периплазме в условиях повышенной продукции супероксида. Ранее мы установили, что транспортер CydDC, единственная из-

вестная система, экспортирующая GSH из цитоплазмы в периплазму, не участвует в выходе GSH в растущей аэробной культуре *E. coli* [1]. Однако при переходе от аэробных к микроаэробным условиям, в мутанте *cydD* наблюдалось сильное ингибирование выхода GSH, в то время как уровень  $GSH_{out}$  в штамме дикого типа продолжал увеличиваться. Экспрессия гена *cydD* индуцируется ArcAB при снижении доступности кислорода. Мониторинг уровня  $GSH_{out}$  в штамме, несущем мутацию в *arcB*, выявил отсутствие накопления GSH в среде после перехода к микроаэробному росту. Выход GSH отсутствовал также у мутанта *menA*, дефицитного по менахинону, необходимому для активации ArcB при переходе к микроаэробным условиям.

Полученные результаты показывают, что при переходе от аэробных к микроаэробным условиям происходит переключение экспорта GSH с неидентифицированной транспортной системы на транспортер CydDC.

В периплазме *E. coli* поддерживаются более окисленные условия, чем в цитоплазме. При экспоненциальном росте соотношение  $GSH:GSSG_{out}$  варьировало у разных мутантов от 5:1 до 3:1 (против 300:1 и более) в цитоплазме. Это соотношение считается оптимальным для образования нативных дисульфидных связей в белках. Переход к микроаэробным условиям у бактерий дикого типа и мутантов *sodC* и *rpoS* сопровождался почти двукратным повышением соотношения  $GSH:GSSG_{out}$ , в то время как в мутантах *menA* и *arcB* это соотношение не изменялось, а у мутантов *cydD* и *gor* падало в 2 раза по сравнению с уровнем в экспоненциальной фазе. Подобные отклонения в изменении редокс-баланса в периплазме могут приводить к нарушениям нормальных процессов адаптации к изменяющимся условиям аэрации.

Исследования поддержаны программой МКБ и грантами РФФИ № 13-04-00706, 13-04-96039.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Smirnova G., Muzyka N., Oktyabrsky O. Microbiol Res 2012, 167, 166-72.
2. Korshunov S., Imlay J. A. J Bacteriol 2006, 188, 6326-6334.
3. Alvarez A., Rodriguez C., Georgellis D. J Bacteriol 2013, 195, 3054-3061.
4. Gort A. S., Ferber D. M., Imlay J. A. Mol Microbiol 1999, 32, 179-91.

## THE ROLE OF THE GLUTATHIONE IN THE PROTECTION OF PERIPLASM OF *ESCHERICHIA COLI* AGAINST ENDOGENOUS SUPEROXIDE UNDER TRANSITION FROM AEROBIC TO MICROAEROBIC GROWTH CONDITIONS

Tuylenev A. V.<sup>1</sup>, Smirnova G. V.<sup>1</sup>, Oktyabrsky O. N.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, UB RAS; <sup>2</sup>Perm State National Research University, Perm, Russia

Previously, the authors have shown a continuous circulation of glutathione (GSH) between cells and the medium in aerobic cultures of *E. coli*. The role of this process in cell physiology remains unclear. Evidence has been provided that an important function of GSH circulation may be to protect the bacteria against endogenous periplasmic superoxide under transition from aerobic to microaerobic growth conditions. This process is controlled by two regulatory systems ArcAB and RpoS.

## ВЛИЯНИЕ ЭКЗОГЕННЫХ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА НА ВЫХОД ГЛУТАТИОНА ИЗ КЛЕТОК *ESCHERICHIA COLI*

Тюленев А. В.<sup>1</sup>, Смирнова Г. В.<sup>1</sup>, Октябрьский О. Н.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН;  
<sup>2</sup>Пермский национальный исследовательский политехнический университет, Пермь, Россия

Изучено влияние экзогенных АФК на экспорт и трансмембранную циркуляцию глутатиона в экспоненциально растущей культуре бактерий *E. coli*. Экспортируемый глутатион участвует в деструкции экзогенных АФК, защищая периплазму бактерий от окислительного стресса. Однако, повышение уровня GSH в периплазме и ускорение его трансмембранной циркуляции увеличивает чувствительность бактерий к последующему пероксидному стрессу.

**Ключевые слова:** АФК, глутатион, периплазма, окислительный стресс.

**Актуальность и цель работы.** В процессе жизнедеятельности аэробные организмы подвергаются воздействию активных форм кислорода (АФК), таких как супероксидный радикал ( $O_2^-$ ) и перекись водорода ( $H_2O_2$ ), способны повредить ДНК, белки и липиды [1]. Для защиты от АФК бактерии обладают антиоксидантными системами, включая супероксиддисмутазы (SOD), каталазы и др. Кроме двух цитоплазматических SOD в периплазме *E. coli* содержится Cu, Zn-SOD (SodC), контролируемая глобальным регулятором RpoS [2]. Предполагается, что основная роль SodC заключается в борьбе с экзо- и эндогенным  $O_2^-$ . В отличие от  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$  легко пересекает клеточные мембраны

и может разлагаться цитоплазматическими каталазами. Важную роль в защите от АФК играет глутатион (GSH), основной редокс-буфер в цитоплазме, способный к прямому взаимодействию с  $O_2^-$  и  $H_2O_2$ . В аэробных условиях в растущих культурах *E. coli* GSH непрерывно циркулирует между клетками и средой [3]. Турновер глутатиона изменяется при стрессовых воздействиях и прекращается при ингибировании дыхания. Мы предположили, что в экспоненциально растущей культуре, когда SodC не индуцирована, трансмембранная циркуляция GSH может вносить вклад в защиту периплазмы от АФК. Данная работа посвящена проверке этой гипотезы.

**Материалы и методы.** Объект исследования – бактерии *E. coli* BW25113 (wt) и мутанты JW2663 ( $\Delta gshA$ ), JW1638 ( $\Delta sodC$ ), JW3467 ( $\Delta gor$ ), JW3412 ( $\Delta ggt$ ), AN2343 (*cydD1*). Штаммы NM3021 (*katG::lacZ*) и NM3041 (*rpoS::lacZ*) сконструированы в нашей лаборатории на основе BW25113. Бактерии выращивали на минимальной среде M9 с глюкозой (0.15%) или на среде MOPS с заданной концентрацией фосфата при 37°C в колбах на качалках при 150 об/мин. Экзогенный  $O_2^-$  генерировали с помощью системы ксантин-ксантиноксидаза (ХО). Восстановленный (GSH) и окисленный глутатион (GSSG) определяли модифицированным методом Титца.  $H_2O_2$  измеряли спектрофлуориметрически с Amplex Red и пероксидазой (AR/HRP). Экспрессию генов *katG* и *rpoS* оценивали по степени индукции  $\beta$ -галактозидазы в штаммах, несущих слияния *katG::lacZ* и *rpoS::lacZ*. Способность к образованию колоний определяли высевом бактерий на чашки с LB-агаром. Выживаемость рассчитывали как отношение числа колоний в образцах, обработанных  $H_2O_2$ , к числу колоний в контроле без обработки (%).

**Результаты.** Обработка клеток *E. coli* BW25113 АФК, генерируемых ксантин-ксантиноксидазой, приводила к ингибированию роста бактерий и выходу GSH из клеток в среду. Интенсивность выхода GSH зависела от концентрации добавленной ХО, т.е. от скорости образования  $O_2^-$ . Ингибирование роста и выход GSH носили обратимый характер: скорость роста восстанавливалась через 40 мин после начала обработки, уровень экстраклеточного GSH возвращался к базовому значению через 60 мин. Для разделения эффектов, производимых  $O_2^-$  и  $H_2O_2$ , образуемой при дисмутации  $O_2^-$ , эксперименты выполняли в присутствии экзогенной SOD или каталазы. SOD, добавленная перед ХО, предотвращала выход GSH, тогда как каталаза не оказывала такого эффекта. Добавление  $H_2O_2$  в концентрации 10 мкМ не стимулировало выход глутатиона. Мы повторили эксперименты со стационарной культурой *E. coli* BW25113, голодающей по фосфату, чтобы исключить эффект возможного наложения эндогенного  $O_2^-$  и экзогенных АФК в растущей культуре. В этих условиях генерируемый  $O_2^-$  так же вызывал выход GSH, свидетельствуя, что именно супероксид может быть первичным стимулом этого процесса.

Индукцированный супероксидом экспорт глутатиона не зависел от наличия в клетках GSH-транспортера CydDC, единственной известной транспортной системы GSH, осуществляющей его экспорт из цитоплазмы в периплазму. Обратимость выхода GSH из клеток нарушалась в мутантах по глутатионредуктазе (GOR), восстанавливающей GSSG, и  $\gamma$ -глутамилтранспептидазе (GGT), периплазматическому ферменту участвующему в гидролизе GSH и возвращении его фрагментов в цитоплазму. Таким образом,  $O_2^-$  стимулировал выход GSH через не идентифицированную систему, а возвращение глутатиона осуществлялось с участием GGT.

В бесклеточной системе АФК, продуцируемые ксантином и ХО, окисляли 60% добавленного GSH, из которых 2/3 подавлялась в присутствии каталазы (результат взаимодействия GSH с  $H_2O_2$ ), 1/3 GSH окислялась  $O_2^-$  и подавлялась SOD. В культуре бактерий дикого типа экзогенные АФК не вызывали повышения концентрации экстраклеточного GSSG. Это могло быть связано с быстрым возвращением GSSG в цитоплазму и с его восстановлением с участием GOR, свидетельством чего является 25% повышение уровня экстраклеточного GSSG у мутантов по генам *ggt* и *gor* в обработанных АФК культурах по сравнению с BW25113. Другой причиной отсутствия аккумуляции GSSG при экспозиции к АФК у клеток дикого типа могла быть деструкция  $H_2O_2$  с участием каталаз. Действительно, анализ экспрессии генов выявил значительную индукцию гена *katG*, кодирующего каталазу HPI. Замедление роста сопровождалось также индукцией RpoS-регулона, в состав которого входит каталаза HPII. В результате, уже через 5 мин после начала экспозиции к экзогенным АФК, концентрация  $H_2O_2$  в среде не превышала 1.3 мкМ. Таким образом, окисление GSH экзогенными АФК в культуре дикого типа маскируется быстрым турновером GSSG и снижается вследствие деструкции АФК с участием ферментов.

АФК, генерируемые ксантин-ксантиноксидазой, существенно снижали удельную скорость роста, но не вызывали гибели клеток. Ингибирование роста у мутантов *sodC*, *ggt* и, особенно, *gshA* было значительно выше, чем у BW25113, что указывает на важную роль продуктов этих генов в защите клеток *E. coli* от окислительного стресса. Внесение экзогенного GSH (100 мкМ) в среду культивирования

до добавления ХО повышало устойчивость *gshA* мутантов к ингибирующему действию экзогенных АФК. Таким образом, защитное действие проявляли как эндогенный, так и экзогенный GSH. Однако, если пробы, отобранные после обработки ксантином и ХО, подвергали последующему сильному пероксидному стрессу, присутствие GSH в среде и клетках усиливало бактерицидное действие  $H_2O_2$ . Эффект может быть связан с тем, что повышенное содержание в периплазме деривата глутатиона – цистеинилглицина, образующегося при гидролизе GSH с участием GGT и являющегося очень хорошим восстановителем, может существенно ускорять формирование гидроксильных радикалов в реакции Фентона, вызывая повреждение и гибель клеток.

В целом, можно заключить, что экзогенный  $O_2^-$  стимулирует экспорт GSH из клеток *E. coli*

и его трансмембранную циркуляцию. Экпортируемый GSH может совместно с антиоксидантными ферментами участвовать в деструкции экзогенных АФК, защищая периплазму бактерий от окислительного стресса. Вместе с тем, повышение уровня GSH в периплазме и ускорение его трансмембранной циркуляции увеличивает чувствительность бактерий к последующему пероксидному стрессу.

Исследования поддержаны грантами программы МКБ и РФФИ № 13-04-00706, 13-04-96039.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Imlay J. A. *Annu Rev Biochem* 2008, 77, 755-76.
2. Gort A. S., Ferber D. M., Imlay J. A. *Mol Microbiol* 1999, 32, 179-91.
3. Smirnova G., Muzyka N., Oktyabrsky O. *Microbiol Res* 2012, 167, 166-72.

### EFFECT OF EXOGENOUS ROS ON THE EXPORT OF GLUTATHIONE FROM *ESCHERICHIA COLI*

Tyulenev A. V.<sup>1</sup>, Smirnova G. V.<sup>1</sup>, Oktyabrsky O. N.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, UB RAS;* <sup>2</sup>*Perm National Research Polytechnic University, Perm, Russia*

Effect exogenous ROS on export and transmembrane circulating glutathione in an exponentially growing culture of bacteria *E. coli* was studied. Exported glutathione is involved in the degradation of exogenous ROS by protecting the bacterial periplasm against oxidative stress. However, high levels of GSH in the periplasm and the acceleration of its transmembrane circulation increases the sensitivity of bacteria to the next peroxide stress.



## РОЛЬ ГЕНОВ ПОЛИАМИНОВОГО МОДУЛОНА В ПЕРСИСТЕНЦИИ *ESCHERICHIA COLI*

Тюленева Е. А.<sup>2</sup>, Кашеварова Н. М.<sup>2</sup>, Сидоров Р. Ю.<sup>1,2</sup>,  
Шумков М. С.<sup>3</sup>, Ткаченко А. Г.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>ФГБОУ ВПО Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь; <sup>2</sup>ФГБУН Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь; <sup>3</sup>Институт биохимии им. А. Н. Баха, РАН, Москва, Россия

С помощью делеционных мутаций генов полиаминового модулона – *rmf*, *yqjD*, *rpoS* по отдельности, а также в комбинации в виде двойных (*rpoS-rmf*) и тройных (*rpoS-rmf-yqjD*) делеций, показано их участие в формировании персистерного состояния клеток *E. coli* при переходе в стационарную фазу периодической культуры. Методом репортерных генных слияний изучены генно-экспрессионные профили клеток для каждого из генов в зависимости от фазы периодической культуры. Все изученные гены делают существенный вклад в персистерный фенотип, величина которого зависит от фазы периодической культуры и в наибольшей степени выявляется по сравнению с контрольной, некокаутированной культурой, в те ее периоды, когда экспрессия каждого из генов или их комбинации находится на максимальном уровне.

**Ключевые слова:** полиамины, персистообразование, «полиаминовый модулон».

**Актуальность и цель работы.** Биогенные полиамины (путресцин, спермидин, спермин) представляют собой алифатические углеводороды, которые встречаются в клетках практически всех живых организмов [1]. Показана роль этих соединений в регуляции генной экспрессии, клеточной пролиферации и защите бактериальной клетки от разнообразных стрессовых факторов, включая воздействия антибиотиков. Гены, экспрессия которых стимулируется полиаминами на уровне трансляции, объединены в структуру, названную «полиаминовый модулон». Недавно нами показано, что продукт одного из таких генов, *RpoS*, достаточно высокое накопление которого в клетках *E. coli* возможно лишь в присутствии полиаминов, положительно регулирует содержание персистеров, высокотолерантных к аминогликозиду нетилмицину [2]. В то же время, до сих пор совершенно неизвестной остается роль в персистообразовании других генов полиаминового модулона. Персистеры – это субпопуляции клеток с замедленным метаболизмом, которые характеризуются ненаследуемой высокой толерантностью к антибиотикам и являются основной причиной затяжных трудноизлечимых инфекций [3].

Поэтому изучение механизмов образования персистеров является актуальной задачей на пути создания средств борьбы с ними. Исходя из этого, целью данной работы является выяснение роли полиамин-зависимых генов в формировании персистерного фенотипа клеток *E. coli*.

**Материалы и методы.** Определение персистерных клеток осуществляли на основе протокола, представленного в статье Keren et al. 2004 [3]. Штаммы *E. coli* культивировали в полноценной питательной среде LB. Используемый антибиотик нетилмицин, относящийся к аминогликозидам, взят в концентрации 2,8 мкг/мл, что на порядок превышает минимальную подавляющую концентрацию (МПК) для исследуемых штаммов. Частоту персистообразования подсчитывали путем деления величины КОЕ/мл в культуре после инкубации с нетилмицином на таковую в культуре без добавки антибиотика.

Генные нокауты конструировали на основе штамма *E. coli* BW25141, любезно предоставленного К. Севериновым (Институт биологии гена РАН, Москва), в соответствии с методикой рекомбинации Datsenko и Wanner [4]. Уровень генной экспрессии определяли с помо-

щью транскрипционных генных *lacZ*-слияний, полученных с использованием в качестве вектора бактериофага  $\lambda$ RS45, в соответствии с методикой Simons [5].

**Результаты.** Недавно с помощью полиамин-дефицитного штамма *E. coli* нами показано, что полиамин путресцин на 3 порядка повышает содержание персистеров в периодической культуре при переходе клеток в стационарную фазу. Этот эффект был частично опосредован через положительное воздействие путресцина на уровень экспрессии *rpoS* – гена полиаминового модулона – и снижался на 2 порядка в результате *rpoS* делеции [2].

На основании анализа этих данных нами сделано предположение о возможности участия в данном процессе, наряду с *rpoS*, и других генов полиаминового модулона. Для проверки этого предположения нами на базе полиамин-профицитного штамма *E. coli* BW 25141 сконструированы мутантные штаммы, несущие делецию (нокаут) как в единичных генах полиаминового модулона (*rmf*, *yqjD*, *rpoS*), так и комбинированные двойной (*rpoS-rmf*) и тройной (*rpoS-rmf-yqjD*) нокауты. С этой целью выбраны те гены стационарной фазы, чьи продукты отрицательно воздействуют на пролиферативные функции клеток, а, следовательно, потенциально могли бы участвовать в формировании их персистерного состояния. Среди них *rmf*, отвечающий за образование димеров 100S рибосом, *rpoS* – ген сигма-субъединицы РНК-полимеразы, а также *rpoS*-зависимый ген *yqjD*, продукт которого локализует 70S и 100S рибосомы на внутренней мембране бактериальной клетки.

Исследования генной экспрессии с помощью сконструированных нами репортерных генных слияний показали, что максимальный уровень экспрессии *rpoS* наблюдается в начале перехода культуры в стационарную фазу ( $\approx 7$  час). В то же время, максимальная экспрессия *rmf* и *yqjD* регистрируется в поздней стационарной фазе (48 час).

Возрастание содержания персистеров в периодической культуре *E. coli* начинается при переходе клеток в стационарную фазу и достигает стабильного максимума к 24 часам культивирования. В этих условиях *rpoS*-но-

каут вызывал наибольшее, приблизительно на 3 порядка, снижение частоты персистеров в культуре нокаутированных клеток по сравнению с контрольной. Единичные нокауты *rmf* и *yqjD* также приводили в этот период к значительному снижению частоты персистообразования, но оно, все же, было на порядок меньше по сравнению с культурой *rpoS*-нокаутированных клеток. Эффект двойного (*rpoS-rmf*) и тройного (*rpoS-rmf-yqjD*) нокаут на уровень частоты персистеров в 24-часовой культуре был приблизительно тем же, что и для единичного *rpoS*. Это свидетельствует о доминировании *rpoS*-делеционной мутации по отношению к двум другим в этот период. Соотношение нокаутных эффектов значительно изменялось через 48 часов культивирования, когда преобладающий отрицательный эффект на частоту персистеров оказывала единичная *rmf* делеция. В то же время, нокаутирование *rpoS* было существенно менее эффективно, а тройной нокаут занимал промежуточное положение по величине отрицательного воздействия на частоту персистеров в этот период.

Таким образом, все изученные нами гены полиаминового модулона делают существенный вклад в формирование персистерного состояния *E. coli*. Величина этого вклада зависит от фазы периодической культуры и в наибольшей степени выявляется по сравнению с контрольной, ненюкаутированной культурой в те ее периоды, когда экспрессия каждого из генов или их комбинации находится на максимальном уровне.

Работа поддержана грантом РФ № 15-13-00092.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tabor C. W., Tabor H. *Microbiol Rev* 1985, 49, 81-99.
2. Tkachenko A. G., Kashevarova N. M., Karavaeva E. A., Shumkov M. S. *FEMS Microbiology Letters* 2014, 361, 25-33.
3. Keren I., Shah D., Spoering A., Kaldalu N., Lewis K. *J Bacteriol* 2004, 186, 8172-8180.
4. Datsenko K. A., Wanner B. L. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000, 97, 6640-6645.
5. Simons R. W., Houman F., Kleckner N. *Gene* 1987, 53, 85-96.

## THE ROLE OF POLYAMINE MODULON GENES IN *ESCHERICHIA COLI* PERSISTENCE

Tyuleneva E.A.<sup>2</sup>, Kashevarova N.M.<sup>2</sup>, Sidorov R.Y.<sup>1,2</sup>,  
Shumkov M.S.<sup>3</sup>, Tkachenko A. G.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Perm State University, Perm; <sup>2</sup>Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms UB RAS, Perm;

<sup>3</sup>A.N. Bach Institute of Biochemistry RAS, Moscow, Russia

Through the knockout mutations with genes of polyamine modulon – *rmf*, *yqjD*, *rpoS*, which were constructed individually or in the forms of double (*rpoS-rmf*) or triple (*rpoS-rmf-yqjD*) combinations, we have shown their participation in the formation of persister state in cells that enter the stationary phase. Using the method of reporter gene fusions gene-expression profiles of cells were studied relatively to all these genes depending on the particular phase of batch culture. All of them appeared to make a significant contribution to cell persister phenotype, which extent was dependent on a particular phase of batch culture and could be optimally distinguished (as compared to control, non-knockout culture) in periods when the expression of a particular gene or gene combinations demonstrated their maximum.

---

---

## ИЗМЕНЕНИЕ УРОВНЯ СУЛЬФИТ ( $\text{SO}_3^{2-}$ ) ИОНА В РАСТУЩИХ КУЛЬТУРАХ *ESCHERICHIA COLI* ПРИ ОКИСЛИТЕЛЬНОМ СТРЕССЕ

Ушаков В. Ю.<sup>1,2</sup>, Смирнова Г. В.<sup>1</sup>, Октябрьский О. Н.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН;

<sup>2</sup>Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

Показано, что дефицит GSH и периплазматической SOD способствует ускоренному вытеканию сульфита из клеток *Escherichia coli*. Экзогенная перекись водорода концентрационно-зависимым образом снижала уровень экстраклеточного сульфита, окисляя его до сульфата. Добавление сульфита в среду защищало бактерии, дефицитные по каталазе НР1, от последующей обработки перекисью водорода.

**Ключевые слова:** редокс-системы клетки, тиолы, активные формы кислорода (АФК).

**Актуальность и цель работы.** При дыхании у бактерий *Escherichia coli* в результате случайного переноса электронов с редокс-центров флавоферментов на кислород может происходить одноэлектронное восстановление молекулы кислорода с образованием анионного радикала супероксида  $\text{O}_2^{\cdot-}$ . Супероксид анион, в свою очередь, может дисмутировать до перекиси водорода, а также окислять железосерные кластеры ферментов в цитоплазме, увеличивая концентрацию свободного железа и способствуя протеканию реакции Фентона с образованием токсичных гидроксильных радикалов, повреждающих все клеточные структуры. Избыток АФК приводит также к нарушению

проницаемости мембран и вытеканию из клеток содержимого цитоплазмы. Нейтрализация  $\text{O}_2^{\cdot-}$  в цитоплазме осуществляется с участием Mn- и Fe-супероксиддисмутаза. Супероксид, образуемый в периплазме в результате аутоокисления дигидроменахинона в дыхательной цепи, нейтрализуется с участием периплазматической Cu, Zn-супероксиддисмутаза SodC. Перекись водорода подвергается детоксикации при помощи каталазы и алкилгидропероксидредуктазы [1]. Помимо ферментов, в защите от АФК могут участвовать низкомолекулярные антиоксиданты, в частности, глутатион (GSH), который в аэробно растущих культурах *E. coli* непрерывно циркулирует между клетками

и средой [2]. Показано, что мутанты по обеим цитоплазматическим супероксиддисмутазам не растут в отсутствие цистеина, поскольку их мембрана становится проницаемой для сульфита ( $\text{SO}_3^{2-}$ ), являющегося промежуточным продуктом при синтезе цистеина. Вытекание сульфита обычно рассматривается как результат окислительного повреждения мембран, однако сульфит обладает высокой восстановительной активностью и может вступать в реакцию с пероксидами в среде и периплазме, способствуя их нейтрализации. С целью проверки возможной антиоксидантной роли сульфита мы изучали динамику его внеклеточного уровня при обработке клеток *E. coli* супероксидом и перекисью водорода.

**Материалы и методы.** В качестве объекта исследований использовали бактерии *E. coli* BW25113 (родитель) и делеционные мутанты по генам, кодирующим первый фермент синтеза глутатиона JW2663 (*gshA*), супероксиддисмутаза JW1638 (*sodC*), менахинон JW3901 (*menA*), каталазу HPI JW3914 (*katG*), а также двойной мутант NM451 (*sodCgshA*).

За ростом бактерий следили путем измерения оптической плотности при длине волны 600 нм ( $\text{OD}_{600}$ ). Клетки из ночной культуры после центрифугирования переносили в 250-мл колбы со 100 мл свежей среды (начальная  $\text{OD}_{600}=0,1$ ) и культивировали на шейкере (150 об/мин) при 37°C до  $\text{OD}_{600}=0,25$ . Затем клетки вновь центрифугировали и ресуспендировали для дальнейших экспериментов в свежей среде M9 (начальная  $\text{OD}_{600}=0,1$ ). В экспериментах с обработкой бактерий перекисью водорода клетки выращивали до  $\text{OD}_{600}=0,2$ , после чего вносили необходимую концентрацию  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Генерацию  $\text{O}_2^{\cdot-}$  осуществляли при помощи субстрат-ферментной пары ксантин и ксантиноксидаза: для этого культуру ресуспендировали в 50-мл колбах с 10 мл свежей среды M9 (с добавлением 1мМ ЭДТА, 50μМ ксантина, рН=8). Бактерии культивировали до  $\text{OD}_{600}=0,2$ , после чего в опытный образец добавляли ксантиноксидазу (0,0002U).

Концентрацию сульфита определяли спектрофотометрическим методом [3].

**Результаты.** Минимальная концентрация сульфита при нормальном аэробном росте была обнаружена в среде культивирования бактерий родительского типа ( $0,49 \pm 0,07 \mu\text{M}$ ). В других исследуемых штаммах *E. coli* базовый уровень  $\text{SO}_3^{2-}$  зависел от характера мутации:

от  $0,96 \pm 0,03 (\mu\text{M})$  у *E. coli gshA* до  $1,87 \pm 0,07 (\mu\text{M})$  у двойного мутанта *sodCgshA*. Концентрация сульфита в мутантах *sodC* и *menA* составляла  $1,05 \pm 0,03 \mu\text{M}$  и  $1,13 \pm 0,03 \mu\text{M}$ , соответственно. Не наблюдалось значительных изменений уровня  $\text{SO}_3^{2-}$  в течение культивирования у всех штаммов, за исключением мутанта *gshA*, у которого концентрация сульфита в среде возрастала в 2 раза за 75 мин культивирования.

Таким образом, дефицит GSH и периплазматической SOD способствовал ускоренному вытеканию сульфита из клеток, что может быть как следствием повышения проницаемости мембран у изученных мутантов, так и потенциальной стратегией защиты бактерий от действия АФК благодаря восстановительным свойствам  $\text{SO}_3^{2-}$ .

Для проверки этих предположений нами были проведены исследования динамики  $\text{SO}_3^{2-}$  в среде культивирования штаммов wt и *gshA* при действии на клетки экзогенного  $\text{O}_2^{\cdot-}$ . В течение 75 мин инкубации клеток с ксантиноксидазой (генерация экзогенного супероксида) наблюдалось достоверное повышение концентрации  $\text{SO}_3^{2-}$  на 20% у бактерий *gshA* по сравнению с клетками родительского типа.

В экспериментах с добавлением разных концентраций экзогенной перекиси водорода к клеткам дикого типа было обнаружено дозозависимое снижение уровня внеклеточного сульфита (концентрация сульфита представлена как отношение  $\mu\text{M}/\text{OD}_{600}$ ): 4,2, 3,6 и 3,1 через 70 мин инкубации бактерий с 100 μM, 1 mM и 2 mM перекиси водорода, соответственно.

Для проверки предположения о потенциальных антиоксидантных свойствах сульфита, были проведены эксперименты с предобработкой растущих клеток *E. coli*  $\text{SO}_3^{2-}$  (100 μM) и последующей обработкой эквивалентной концентрацией  $\text{H}_2\text{O}_2$ . У бактерий wt и *gshA* скорости роста после действия оксиданта и при совместной обработке клеток  $\text{SO}_3^{2-}$  и  $\text{H}_2\text{O}_2$  не отличались и были равны 06 ч<sup>-1</sup>. Достоверная разница была обнаружена только у штамма, дефицитного по каталазе HPI: внесение сульфита до обработки  $\text{H}_2\text{O}_2$  повышало скорость роста бактерий на 40% по отношению к контрольному образцу, инкубируемому в присутствии  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Исследования поддержаны Программой МКБ и грантами РФФИ № 13-04-00706, 13-04-96039.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Cabiscol E., Tamarit J., Ros J *Internatl Microbiol* 2000, 3, 3–8.
2. Смирнова Г. В., Октябрьский О. Н. *Биохимия* 2005, 70 (11), 1459–1473.
3. Bastiat B., Sauviac L., Picheraux C., Rossignol M., Bruand C. *PLOS ONE* 2012, 7 (11), 1–15.

## CHANGES IN THE LEVEL OF SULFITE ANION ( $\text{SO}_3^{2-}$ ) IN GROWING CULTURES OF *ESCHERICHIA COLI* UNDER OXIDATIVE STRESS

Ushakov V. Y.<sup>1,2</sup>, Smirnova G. V.<sup>1</sup>, Oktyabrsky O. N.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, UB RAS; <sup>2</sup>Perm State National Research University, Perm, Russia*

In this study, we have shown that deficiency in GSH and periplasmic SodC provoked accelerated efflux of sulfite from *Escherichia coli* cells. Exogenous hydrogen peroxide decreased the level of extracellular sulfite in a dose-dependent manner owing to its oxidation to sulfate. Sulfite addition protected *katG* mutant lacking of catalase HPI against subsequent treatment with hydrogen peroxide.

## ПРЕБИОТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА КУЛЬТУРАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ *LACTOBACILLUS PLANTARUM*

Швец А. С.<sup>1</sup>, Кудрина Е. А.<sup>1</sup>, Литасова А. С.<sup>1</sup>,  
Максимов А. Ю.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>*ФГБОУ ВПО Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь; <sup>2</sup>ФГБУН Институт экологии и генетики УрО РАН, Пермь, Россия*

По результатам ГХ-МС показано, что основным метаболитом надосадочной жидкости *L. plantarum* 8P-A3 является молочная кислота (70%). Другие продукты метаболизма (16% от общего количества растворенных веществ) включали аминокислоты, пептиды, одноосновные карбоновые кислоты, глицериновую кислоту, пирролидон-5-карбоксильную кислоту, жирные кислоты, многоатомные спирты и сахара. Показано, что культуральная жидкость *L. plantarum* 8P-A3 и два вида ультрафильтра проявляют антагонистическое действие по отношению к *E. coli* К-12 и *B. subtilis* ATCC 6633. При этом минимальная концентрация ультрафильтра проявляла ростстимулирующее действие на *L. plantarum* 8P-A3.

**Ключевые слова:** антагонизм, лактобактерии, пребиотики, пробиотики, экзометаболиты.

В настоящее время высокоактуальной для практической медицины является проблема дисбактериозов, которые сопутствуют многим заболеваниям, являются следствием различных физиологических состояний и лечения инфекций. Опубликовано достаточное количество работ, посвященных состоянию микробиоты кишечника человека, в которой показано, что качественные и количественные изменения состава кишечной микрофлоры сопутствуют многим патологическим состояниям организма, а также, во многих случа-

ях, являются причиной или потенцирующим фактором для болезней пищеварения, обмена веществ, иммунодефицитных состояний, патологии внутренних органов [4].

В. М. Бондаренко с соавторами показали, что главная (резидентная) флора толстой кишки представлена бифидобактериями, бактероидами и лактобациллами, что составляет до 90% всей микробиоты кишечника [1]. Установлено, что бифидо- и лактобактерии способны воздействовать на различные звенья иммунной системы, регулируя неспецифический

и специфический клеточный и гуморальный иммунитет, а также индуцировать синтез иммуноглобулинов и интерферона [2].

Многочисленные публикации специалистов свидетельствуют о необходимости включения пробиотиков, пребиотиков и симбиотиков в схемы лечения как дисбактериозов, так и различных соматических заболеваний. До настоящего времени не выясненным до конца остается механизм действия экзометаболитного комплекса лактобактерий, присутствующего в культуральной жидкости.

**Целью** настоящей работы является изучение пребиотических свойств экзометаболитного комплекса лактобактерий.

Оценивали антимикробную активность по отношению к бактериям *Bacillus subtilis* ATCC6633, *Escherichia coli* K12 у образцов, полученных путем фракционирования культуральной жидкости *L. plantarum* 8P-A3. Минимальную подавляющую концентрацию культуральной жидкости по отношению к *E. coli* и *B. subtilis* определяли методом разведений в жидкой питательной среде LB на микробиологических планшетах. Плотность культуры оценивали спектрофотометрически по изменению оптической плотности при длине волны 540 нм.

Методом газовой хромато-масс-спектрометрии были исследованы компоненты надосадочной жидкости *L. plantarum* 8P-A3. Показано, что в условиях эксперимента основным метаболитом надосадочной жидкости, полученной на 60 ч культивирования лактобацилл, является молочная кислота, составляющая 70% от общего количества метаболитов. Вторым значимым компонентом надосадочной жидкости, содержание которого достигало 14%, являются соли и комплексы фосфорной кислоты. Остальные компоненты, составляющие в сумме 16% от общего количества растворенных веществ, включали аминокислоты (валин, треонин, аспарагиновая кислота), пептиды, одноосновные карбоновые кислоты (масляная, пропионовая, бутандиоловая), трехатомно-одноосновную глицериновую кислоту, пирролидон-5-карбоксылную кислоту, жирные кислоты (транс-9-октадеценовая кислота и др.), многоатомные спирты и сахара.

Исследовано антибактериальное действие культуральной жидкости *L. plantarum* 8P-A3. Минимальную подавляющую концентрацию культуральной жидкости по отношению

к *E. coli* K12 и *B. subtilis* ATCC6633 определяли методом разведений в жидкой питательной среде МРС-2 на микробиологических планшетах. Показано, что антибактериальная активность по отношению к тест-культурам *E. coli* K12 и *B. subtilis* ATCC6633 наблюдается в разведениях от 1:2 на 2 сутки роста *L. plantarum* 8P-A3 до 1:32 на 5 сутки роста. Культуральная жидкость *L. plantarum* 8P-A3 проявляла большее антибактериальное действие к тест-культуре *E. coli* K12, чем к *B. subtilis* ATCC6633. Установлено, что в аналогичных условиях ультрафильтрат культуральной жидкости, полученный с использованием полых волокон с отсечкой 15 кДа, не проявил существенного ингибирующего действия на тест-культуры *E. coli* K12 и *B. subtilis* ATCC6633. Это свидетельствует о том, что в качестве ингибитора выступает не молочная кислота, как предполагалось ранее, а более высокомолекулярный компонент, предположительно, пептидной природы.

Установлено, что диапазон концентраций ультрафильтрата *L. plantarum* 8P-A3 при которых наблюдается ростстимулирующая активность по отношению к этой же культуре, составляет от 1:2 до 1:8. При этом не было обнаружено различий в активности стабилизированного (автоклавированного) и нестабилизированного ультрафильтрата.

Таким образом, культуральная жидкость *L. plantarum* 8P-A3 в условиях проведенных экспериментов проявляет выраженное антибактериальное действие по отношению к *E. coli* K-12 и *B. subtilis* ATCC6633, и в тоже время может выступать как ростстимулирующий агент для самого пробиотического штамма. В то же время образцы ультрафильтрата данной культуры с отсечкой 15 кДа не проявляли существенной антибактериальной активности. Следовательно, антибактериальное действие экзометаболитного комплекса данного штамма преимущественно обусловлено действием высокомолекулярных компонентов.

Работа поддержана программой УрО РАН Молекулярная и клеточная биология и проектом в рамках государственного задания № 6.2635.2014/К.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бондаренко В. М., Воробьев А. А. // Журн. микробиол. – 2004. – № 1. – С. 84-92.
2. Доронин А. Ф., Шендеров Б. А. Функциональное питание. – М.: Грантъ, 2002. – 295 с.

3. Чичерин И. Ю., Погорельский И. П., Лундов-ких А. И. и др. // Журн. Инфектологии – 2013.– Т. 5.– № 3.– С. 50-55.
4. Tannock G. W. // Microbiol. Sci.– 1988.– N. 1.– P. 663-673.

## PREBIOTIC PROPERTIES OF CULTURE LIQUID OF *LACTOBACILLUS PLANTARUM*

Shvets A. S.<sup>1</sup>, Kudrina E. A.<sup>1</sup>, Litasova A. S.<sup>1</sup>, Maksimov A. Y.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Perm State National Research University; <sup>2</sup>Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, RAS, Perm, Russia

By GC/MS was shown that main metabolite of supernatant *L. plantarum* 8P-A3 is lactic acid (70%). Other products of metabolism (16% of total dissolved agents) consist amino acids, peptides, monocarboxylic acids, glyceric acid, pyrrolidone-5-carboxylic acid, fatty acids, polyatomic alcohols and sugars. Authors were revealed that culture liquid of *L. plantarum* 8P-A3 has antagonistic effect on *E. coli* K-12 and *B. subtilis* ATCC 6633. The minimum concentration stimulates the growth of *L. plantarum* 8P-A3.

---

---

## ВКЛАД МАЛЫХ СИГНАЛЬНЫХ МОЛЕКУЛ – ПОЛИАМИНОВ И ИНДОЛА – В РЕГУЛЯЦИЮ ПРОЦЕССОВ РОЕНИЯ И БИОПЛЁНКООБРАЗОВАНИЯ

Юрченко А. В.<sup>1,2</sup>, Нестерова Л. Ю.<sup>1</sup>, Ткаченко А. Г.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>ФГБУН Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН;  
<sup>2</sup>ФГБОУ ВПО Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

Индол и полиамины (путресцин и спермидин) оказывают аддитивные регуляторные эффекты на процессы роения и формирования биопленок *Escherichia coli*. Присутствие индола в среде увеличивает биоплёнкообразование и снижает способность к роению. В свою очередь полиамины оказывают стимулирующее действие на оба процесса, в том числе и в присутствии индола. Добавка индола увеличивает концентрацию внутриклеточных полиаминов, которые, как показано ранее, увеличивают антибиотикотолерантность *E. coli*. Обнаруженный нами положительный эффект индола на антибиотикотолерантность, частично может быть опосредован через его воздействие на содержание полиаминов в клетке.

**Ключевые слова:** индол, полиамины, биоплёнкообразование, роение, антибиотикочувствительность.

**Актуальность и цель работы.** Сложный комплекс реакций микроорганизмов по поиску оптимальных для жизнедеятельности условий и развитию толерантности в ответ на неблагоприятные воздействия находится под контролем множества регуляторных факторов. Среди них значительная роль принадлежит малым сигнальным молекулам – факторам межклеточной коммуникации, продукция которых зависит от плотности популяции микроорганизмов (Quorum sensing, QS). Это

объединяет клетки в согласованно реагирующие сообщества, где стратегия перемещения и экспансии (роение) чередуется со стратегией выживания посредством формирования «оседлых» биопленочных сообществ, обладающих высоким адаптивным потенциалом.

Одной из наиболее распространенных у энтеробактерий внутривидовых сигнальных молекул QS является индол – продукт деградации триптофана. Достигая своей пороговой концентрации в среде культивирования, он

оказывает регуляторное воздействие на уровне генной экспрессии, опосредованное через LuxR-подобный белок SdiA, который способен взаимодействовать с многочисленными эффекторами и изменять специфичность распознавания генов мишеней [1]. В последнее время в литературе появляются указания на то, что, наряду с индолом, функциями сигнальных молекул QS могут обладать полиамины [2]. В связи с этим, нельзя исключить возможность взаимодействия полиаминов и индола (в том числе, как эффекторов SdiA) в регуляции поведенческих реакций клеток *E. coli*, связанных с роением и биопленкообразованием.

Существенные изменения двигательного аппарата и метаболизма клеток, при переходе от подвижного образа жизни (плавание и роение) к неподвижному (биопленкообразование) дают основание рассматривать эти процессы как стадии дифференцировки микробного сообщества на уровне социального поведения. Такая стратегия обусловлена возрастанием вероятности неблагоприятных воздействий при исчерпании источников питания, изменении параметров среды и воздействии ингибиторов. В процессе такой дифференцировки происходит возрастание толерантности клеток к стрессорным факторам, в том числе антибиотикам.

Опубликованные к настоящему времени данные об участии индола и полиаминов в регуляции подвижности, биопленкообразования и антибиотикотолерантности противоречивы, а их совместные эффекты на эти процессы – совершенно не изучены. Исходя из этого, целью настоящей работы является исследование совместного воздействия двух типов сигнальных молекул в различном их сочетании на поведенческие реакции микроорганизмов и уровень толерантности *E. coli* к антибиотикам.

**Материалы и методы.** В работе использованы штаммы *E. coli* с ненарушенным синтезом полиаминов – GC4468 и GGB 2600 и полиаминдефицитные мутанты SL60 и HT306, способные только к транспорту полиаминов из среды. Способность к роению определяли на чашках Петри с полужидким агаром (0,4%). Биоплёнки выращивали на полистироловых 96-луночных планшетах и окрашивали генцианвиолетом.

**Результаты.** Ранее нами показано, что полиамины повышают толерантность *E. coli* к антибиотикам различных классов [3]. Данные литературы о влиянии индола на анти-

биотикочувствительность немногочисленны и противоречивы.

Результаты настоящей работы показали, что добавки в среду индола повышают толерантность *E. coli* к антибиотикам, приводя к увеличению минимальной подавляющей концентрации (МПК) для левофлоксацина в 2, цефотаксима в 1,5, а амикацина в 2,5 раза в отношении родительского штамма, тогда как эффект индола на МПК полиамин-дефицитного штамма был ниже, и максимальная кратность возрастания МПК составила для левофлоксацина – 1,25, а для цефотаксима и амикацина – 1,5.

Изучение влияния индола на роение показало, что его добавка к среде значительно снижала подвижность бактерий, в то время как внесение в среду полиаминов повышало этот показатель почти в 2 раза. Снижение роения полиамин-дефицитного штамма было более значительным, а эффект полиаминов на фоне индола – более заметным, чем у полноценного штамма, что вызвано различием уровня внутриклеточных полиаминов.

Нами показано, что внесение в среду индола стимулировало биопленкообразование *E. coli*. При этом наибольший эффект при культивировании на полноценной питательной среде LB наблюдался в присутствии 500 мкМ индола, тогда как его максимальное воздействие на глюкозо-минеральной среде M9 вызывала на порядок меньшая концентрация (50 мкМ). Это, по-видимому, обусловлено тем, что клетки, растущие на богатой среде, содержащей триптофан, продуцируют индол, который оказывает стимулирующее влияние на биопленкообразование и маскирует эффект при внесении в среду его низких концентраций. Этим же можно объяснить более высокий уровень удельного биопленкообразования в контрольной культуре на богатой питательной среде, по сравнению с этим показателем на минеральной среде.

Внесение в среду полиаминов (путресцин, спермидин) также приводило к значительному возрастанию биопленкообразования. Однако ещё более значительное увеличение этого показателя (почти в 2 раза) наблюдалось при совместном внесении в среду культивирования индола и полиаминов, как результат суммирования их эффектов.

Исследование влияния индола на содержание полиаминов в клетке показало, что его добавка в среду культивирования приводила



к возрастанию содержания внутриклеточных полиаминов путресцина и спермидина приблизительно в 2 раза. Не исключено, что уменьшение чувствительности *E. coli* к антибиотикам при добавке в среду индола может быть следствием возрастания содержания полиаминов. В пользу этого предположения говорит и тот факт, что эффект индола сильнее проявляется в культуре штамма, способного к синтезу полиаминов.

Таким образом, индол и полиамины оказывают аддитивные регуляторные эффекты на процессы роения и формирования биопленок, что в конечном итоге приводит к возрастанию толерантности клеток *E. coli* к антибиотикам. Положительный эффект индола на антибиотикотолерантность частично мо-

жет быть опосредован через его воздействие на содержание полиаминов в клетке. Разнонаправленность эффектов индола и полиаминов на процесс роения указывает на сложность механизмов их взаимодействия в качестве сигнальных молекул QS в процессах регуляции поведенческих реакций *E. coli*.

Работа поддержана грантом РФФИ 13-04-96002-р\_урал\_a

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Shimada T. et al. Genes Cells 2014, 19 (5), 405-418.
2. El-Halfawy O., Valvano M. Future Microbiology 2013, 8 (11), 1357-1359.
3. Tkachenko A. G., Akhova A. V., Shumkov M. S., Nesterova L. Y. Research in microbiology 2012, 163 (2), 83-91.

### SMALL SIGNALING MOLECULES – POLYAMINES AND INDOLE – IN CONTROL OF SWARMING AND BIOFILM FORMATION

Yurchenko A. V.<sup>1,2</sup>, Nesterova L. Y.<sup>1</sup>, Tkachenko A. G.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, UB RAS; <sup>2</sup>Perm State National Research University, Perm, Russia

Indole and polyamines (putrescine and spermidine) were shown to regulate *Escherichia coli* swarming and biofilm formation. Medium supplementation with indole increases biofilm formation and reduces bacterial swarming. However, polyamines stimulate both of these processes regardless of whether the medium was supplemented with indole or not. Furthermore, indole is also able to increase the concentration of intracellular polyamines, which in turn upregulate cell antibiotic tolerance. Therefore, positive effects of indole on *E. coli* antibiotic tolerance could at least partially be mediated through its influence on cell polyamines' pool.



**Раздел 3**  
**ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ МИКРО-**  
**И МАКРООРГАНИЗМОВ**

## ВЛИЯНИЕ ПРОБИОТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ БАКТЕРИЙ РОДА *BACILLUS* НА ПОКАЗАТЕЛИ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОГО ИММУНИТЕТА ПРИ ИНТОКСИКАЦИИ ЖЕЛЕЗОМ

Барышева Е. С., Сизенцов А. Н., Климова Т. А.

ФГБОУ ВПО Оренбургский государственный университет,  
Оренбург, Россия

В публикации представлены данные о влиянии пробиотических препаратов на основе бактерий рода *Bacillus* на бета-литическую и лизоцимную активность сыворотки крови лабораторных животных при создании экспериментальной интоксикации сульфатом железа. Полученные данные свидетельствуют об эффективном использовании пробиотиков с целью стимуляции показателей неспецифической резистентности, а также предотвращают иммунодефицитные состояния, возникающие вследствие интоксикации ионами железа.

*Ключевые слова:* неспецифическая резистентность, интоксикация железом, пробиотики.

Несмотря на то, что железо является незаменимым микроэлементом, который участвует в основных жизненно важных функциях организма, таких как образование железосодержащих молекул и нормальном функционировании железозависимых реакций, его повышенное содержание в организме может быть вызвано повышенной абсорбцией, парентеральным его введением или комбинацией обоих механизмов. Избыток железа депонируется в значительной степени в виде гемосидерина в ретикулоэндотелиальных клетках или в паренхиматозных клетках некоторых тканей. При этом избавиться от избытка железа часто намного труднее, чем устранить его дефицит.

Пристальный интерес исследователей к данному микроэлементу связан не столько с распространенностью железа в природе, сколько с его участием в сложных метаболических процессах человеческого организма. Немаловажен тот факт, что концентрация железа в организме регулируется исключительно поглощением, а не выделением [1].

Металлы по сравнению с другими элементами имеют способность к биоаккумуляции. Известно, что микроорганизмы способны из-

влекать и концентрировать металлы. Также данной способностью обладают микроорганизмы, которые входят в состав пробиотических препаратов, в частности бактерии рода *Bacillus* [2].

На основании вышеизложенных данных перед нами была поставлена следующая цель: изучить эффективность применения пробиотических препаратов на основе бактерий рода *Bacillus* в системе выведения из организма избыточных содержаний железа по средству оценки гематологических, биохимических показателей крови и показателей неспецифической резистентности, а также исследования патоморфологических изменений органов-мишеней и содержания железа в различных тканях животного.

Для исследования возможностей выведения ионов железа нами были выбраны пробиотические препараты, так как входящие в их состав бактерии рода *Bacillus* обладают уникальной способностью к биоаккумуляции металлов [3,4]. В качестве пробиотических препаратов нами были использованы: Споробактерин (*Bacillus subtilis* 534), Бактисубтил (*Bacillus cereus* IP 5832), Ветом-2 (*Bacillus*

*subtilis* ВКПМ В 7048 и *Bacillus licheniformis* ВКПМ В 7038). В качестве токсиканта использовали – FeSO<sub>4</sub> (сульфат железа). Все исследования были выполнены на модели групп-аналогов лабораторных животных (крыс) породы «Вистар». Экспериментальная часть была выполнена на базе экспериментально-биологической клиники (вивария) Оренбургского государственного университета.

С целью проведения исследования из 96 особей крыс было сформировано восемь групп – пять контрольных и три опытных. Первая контрольная группа получала основной рацион (К<sub>0</sub>), вторая – основной рацион с добавлением сульфата железа из расчёта 150 мг/кг веса тела (К<sub>1</sub>), третья – основной рацион с добавлением «Споробактерина» (К<sub>2</sub>), четвертая – основной рацион с добавлением «Ветом-2» (К<sub>3</sub>), пятая – основной рацион с добавлением «Бактисубтила» (К<sub>4</sub>). Три опытные группы получали основной рацион с добавлением сульфата железа и пробиотиков – «Ветом-2» (О<sub>1</sub>), «Споробактерин» (О<sub>2</sub>), «Бактисубтил» (О<sub>3</sub>).

Соль металла задавалась в первый день эксперимента (однократно), а пробиотические препараты с 1 по 7 сут. Взятие материала проводилось с периодичностью в 7 сут (фоновое исследование, 7, 14, 21 сут) в течение 21 сут путём убоя животных методом декапитации.

После затравки соли металла и дачи пробиотических препаратов животные наблюдались, и проводилось взятие материала с периодичностью в 7 сут (фоновое исследование, 7, 14, 21 сут) в течение 21 сут путём убоя животных методом декапитации.

В качестве показателей естественной резистентности нами выбраны лизоцимная активность и активность бета-лизинов. Методика выполнения: Определение лизоцимной активности по О. В. Бухарину. Бета-литическую активность определяли фотонейлометрическим методом по О. В. Бухарину.

Лизоцим (мурамидаза) является одним из важных факторов неспецифической защиты организма. Ферментативная специфичность лизоцима заключается в разрушении связи между N-ацетилмураминовой кислотой и N-ацетилглюкозамином в мукополисахариде, составляющем оболочку многочисленных микроорганизмов.

В ходе проводимых исследований было установлено, что лизоцимная активность по отношению к фоновым значениям в группе

контроля металла на 7 сут исследования наблюдалось увеличение на 31,0%; на 14 сут исследования на 30,5%; на 21 сут исследования на 22,8%. По отношению к фоновым значениям на 7 сут в опытных группах О<sub>1</sub>, О<sub>2</sub> и О<sub>3</sub> наблюдалось увеличение на 19,0%, 20,7%, 24,1%; на 14 сут исследования – на 18,6%, 22,0% и 18,6%; на 21 сут исследования – на 12,3%, 14,0% и 7,0%. По отношению к группе контроля металла на 7 сут эксперимента в опытных группах О<sub>1</sub>, О<sub>2</sub>, О<sub>3</sub> значения были меньше на 9,2%, 7,9% и на 5,3%; на 14 сут исследования показатели опытных групп О<sub>1</sub>, О<sub>2</sub>, О<sub>3</sub> были меньше на 9,1%, 6,5% и на 9,1%; на 21 сут исследования показатели всех опытных групп были меньше на 8,6%, 7,1% и 12,9%.

Бета-литическая активность. По отношению к фоновым значениям в группе контроля металла на 7 сут исследования наблюдалось увеличение на 45,4%; на 14 сут исследования на 60,8%; на 21 сут исследования на 57,8%. По отношению к фоновым значениям на 7 сут в опытных группах О<sub>1</sub>, О<sub>2</sub> и О<sub>3</sub> наблюдалось увеличение на 59,0%, 68,1%, 59,0%; на 14 сут исследования – на 47,8%, 52,1% и 52,1%; на 21 сут исследования – на 47,3%, 36,8% и 36,8%. По отношению к группе контроля металла на 7 сут эксперимента в опытных группах О<sub>1</sub>, О<sub>2</sub>, О<sub>3</sub> значения были больше на 9,3%, 15,6% и на 9,3%; на 14 сут исследования показатели опытных групп О<sub>1</sub>, О<sub>2</sub>, О<sub>3</sub> были меньше на 8,1%, 5,4% и на 5,4%; на 21 сут исследования показатели всех опытных групп были меньше на 6,6%, 13,3% и 13,3%.

Из полученных данных следует, что применение пробиотических препаратов на основе бактерий рода *Bacillus* оказывает стимулирующее действие на лизоцимную и бета-литическую активность сыворотки как в опытных, так и в контрольных группах.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Сизенцов А. Н., Кван О. В., Нотова С. В., Гальченко Т. А. Вестник восстановительной медицины 2014, 2, 66-75.
2. Сизенцов А. Н., Исайкина Е. Ю., Кван О. В., Сизова Е. А. Современные проблемы науки и образования 2014, 3.
3. Sizentsov A, Kvan O., Vishnyakov A., Babushkina A., Drozdova E. Life Science Journal 2014, 11 (10), 18-20.
4. Сизенцов А. Н., Кван О. В., Гальченко Т. А. Современные проблемы науки и образования 2013, 5, 503.

## INFLUENCE OF PROBIOTIC PREPARATIONS BASED ON GENUS *BACILLUS* ON NONSPECIFIC IMMUNITY INDICATORS AT IRON-INDUCED INTOXICATION

Barysheva E. S., Sizentsov A. N., Klimova T. A.

Orenburg State University, Orenburg, Russia

Influence of probiotic preparations based on *Bacillus* bacteria on beta-lyzine and lysozyme activity of blood serum of the laboratory animals at experimental intoxication by iron sulfate is presented. The obtained data testify the effective use of probiotics for the stimulation of nonspecific resistance, and also for prevention the immunodeficiency arising as the iron ion intoxication consequence.

## ВЛИЯНИЕ ГОМОСЕРИНЛАКТОНОВ НА СЕРОРЕЗИСТЕНТНОСТЬ БАКТЕРИЙ

Григорьева О. В., Каримов И. Ф.

ФГБОУ Оренбургский государственный университет, Оренбург, Россия

Выявлено повышение серорезистентности рекомбинантного люминесцирующего штамма *S. typhimurium* LT2 при предварительной инкубации клеток в присутствии охoС6-ГСЛ. Это обеспечивается активацией ряда генов вирулентности, в том числе и *rck*, что было показано с использованием штамма *S. typhimurium* LT2, несущего плазмиду с генетической конструкцией *rck::luxCDABE*.

**Ключевые слова:** система комплемента, серорезистентность, *Salmonella*, гомосеринлактон.

**Актуальность и цель работы.** Эволюционное развитие системы комплемента сопровождалось формированием некоторых микроорганизмов, вызывающих инфекционные заболевания, способностью противостоять воздействию белков этой системы, используя различные механизмы уклонения путем образования капсул или поверхностных молекул, либо путем связывания реакционных белков или их расщепления [1].

Другие микроорганизмы приобрели способность к формированию кворумзависимого механизма резистентности к системе комплемента путем индукции ряда генов патогенности, которые активируются в результате восприятия регуляторных молекул. У большинства видов грамотрицательных бактерий такими молекулами являются ГСЛ. Это низкомолекулярные химические вещества, имеющие общее гомосеринлактоновое кольцо, а также различные по своей длине и строению ацильные радикалы [2].

Такой кворумзависимый механизм выхода из-под удара комплемента обнаружен у бактерий вида *Salmonella enterica*. Это один из клинически значимых патогенных микроорганизмов, вызывающих кишечные заболевания. У сальмонелл имеется система чувства кворума, основанная на белке SdiA, являющаяся аналогом LuxR белков, широко распространенной среди грамотрицательных микроорганизмов. Однако сальмонеллы не продуцируют собственную синтетазу ГСЛ, но могут обнаруживать и связывать аутоиндукторы, произведенные другими видами бактерий [3].

Связывание SdiA с аутоиндуктором приводит к активации генов островка патогенности 1 (SPI-1), в том числе и оперона *rck*, кодирующего ген резистентности системе комплемента. Этот ген был обнаружен на плаزمиде вирулентности *S. typhimurium* и *S. enteritidis*, ниже по течению от Pef оперона, продукт экспрессии которого в дополнение к адгезии и возможности инвазии, также обеспечивает высокий

уровень устойчивости к системе комплемента, путем фиксации фактора H и ингибирования полимеризации белка C9 системы комплемента на бактериальной мембране [4, 5].

В связи с вышесказанным, целью нашего исследования стало изучение влияния гомосеринлактонов на серорезистентность бактериальных штаммов *E. coli* MG1655 и *S. typhimurium* LT2.

**Материалы и методы.** В работе использовались рекомбинантные люминесцирующие штаммы *E. coli* MG1655 и *S. typhimurium* LT2 с плазмидами, в которых клонированы *luxCDABE* гены *Photobacterium luminescens*, а также штамм *S. typhimurium* LT2 *rck:luxCDABE*, отвечающий индукцией свечения в ответ на активацию промотора *rck*.

При исследовании использовались суточные культуры бактерий, выращенные при температуре 37 °C на LB-агаре (Sigma, США) с добавлением 100 мкг/мл ампициллина для штаммов *E. coli* MG1655 и *S. typhimurium* LT2 *rck:lux*, и 125 мкг/мл тетрациклина для *Salmonella* LT2 pACXen, после чего полученную биомассу переносили в свежий LB-бульон (Sigma, США) и доводили их оптические плотности до 0,35 ед. при 450 нм на фотометре STAT FAX 303 VIS+.

В качестве регуляторных молекул были использованы пять образцов ГСЛ, ацильные хвосты которых представлены бутаноилом (C4), гексаноилом (C6), 3-оксо-гексаноилом (охоC6), додеканоилом (C12) и 3-оксо-додеканоилом (охоC12) (Sigma, США).

Источник бактерицидных систем служила сыворотка крови, полученная от нормальных здоровых доноров, а также пул сывороток, полученных при смешивании равных объемов 40 образцов сывороток.

Оценка серорезистентности производилась параллельно биолюминесцентным методом в течение 1 часа с помощью планшетного люминометра LM-01T (Immunotech, Чехия) и нефелометрическим методом в течение 3 часов.

Результаты исследований обработаны с использованием пакета программ Statistica методами регрессионного и корреляционного анализа.

**Результаты.** На первом этапе была оценена чувствительность *E. coli* MG1655 и *S. typhimurium* LT2 к нативной сыворотке, при этом подобный контакт вел к дозозависимому тушению свечения, которое для концентраций

от 6% до 25% вели к формированию плато на 30-й минуте контакта, к тому же *S. typhimurium* LT2 характеризовались чуть большей устойчивостью по сравнению с *E. coli* MG1655. С другой стороны, выключение системы комплемента вело к потере бактерицидного потенциала сыворотки крови, и только высокие её концентрации проявляли незначительный бактерицидный эффект.

Сопоставление результатов биолюминесценции и нефелометрии методов выявило зависимость между уровнем остаточной люминесценции и бактерицидной активностью сыворотки, для *E. coli* описываемое коэффициентом  $r = -0,581$  с уровнем значимости 0,05, а для *S. typhimurium*  $r = -0,815$  с уровнем значимости 0,01.

На следующем этапе было выявлено, какой из используемых ГСЛ обеспечивает запуск промотора *rck*, при этом в качестве контролей были использованы штаммы *E. coli* MG1655 и *S. typhimurium* LT2 с конститутивным свечением. Как и ожидалось, штаммы *E. coli* MG1655 и *S. typhimurium* LT2 не отреагировали ни на один из используемых ГСЛ, тогда как штамм с плазмидой *rck:lux* продемонстрировал максимальный уровень свечения в ответ на охоC6-ГСЛ в диапазоне концентраций от  $10^{-6}$  М до  $10^{-4}$  М, тогда как для C6-ГСЛ максимум наступает при  $5 \cdot 10^{-5}$  М, C12-ГСЛ только на  $10^{-4}$  М, а C4-ГСЛ и охоC12-ГСЛ не обеспечивали активацию данного промотора.

Оценка изменения выживаемости штаммов *E. coli* MG1655 прединкубированной с различными концентрациями ГСЛ от  $10^{-4}$  до  $10^{-6}$  М в присутствии сыворотки крови во всех случаях показало одинаковую бактерицидную активность сыворотки крови, не зависящей от присутствия аутоиндуктора в среде. В случае с *S. typhimurium* LT2, выявлено, что охоC6-ГСЛ как в биолюминесцентном, так и в нефелометрическом методе выявило повышение выживаемости данного штамма при использовании концентрации  $10^{-4}$  М. Однако только биолюминесцентный метод показал снижение бактерицидного эффекта в результате прединкубации с C12 и охоC12-ГСЛ.

Результаты корреляционного анализа подтверждают установленную ранее обратную зависимость от уровня свечения и бактерицидной активности сыворотки крови для *E. coli* описываемую коэффициентом  $r = -0,250$  с уровнем значимости 0,01 и для *Salmonella*

$r = -0,734$  с таким же уровнем значимости. Также была установлена зависимость свечения штамма *S. typhimurium* LT2 в присутствии oхoC6, C12 и oхoC12-ГСЛ при воздействии сыворотки крови, тогда как свечение для *E. coli* MG1655 связано с присутствием C4 и к тому же этот ГСЛ усиливает бактерицидную активность сыворотки крови в отношении сальмонелл.

Таким образом, резистентность *S. typhimurium* LT2 к бактерицидному действию сыворотки крови обеспечивается в наибольшей степени гексаноил-гомосеринлактоном, тогда как у *E. coli* MG1655 подобного эффекта не обнаружено. Полученные результаты позволяют

с другой стороны рассмотреть инфекционный процесс и разработать методы снижения патогенности бактериальных штаммов через модуляцию системы чувства кворума.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Catharine M. M., Michael M. F. Springer Sernin Immunopathol. 1994, 15, 327-344.
2. Soares J. A., Ahmer B. M. Curr Opin Microbiol 2011, 14, 188-193.
3. Bindhu M. et al. J Bacteriol 2001, 183 (19), 5733-5742.
4. Janssens J. C. et al. App. Environmental Microbiol 2007, 73, 535-544.
5. Rosselin M. et al. Cell Research 2010, 20, 647-664.

### HOMOSERINE LACTONE EFFECT ON BACTERIA SERUM RESISTANCE

Grigoreva O. V., Karimov I. F.

Orenburg State University, Orenburg, Russia

Increased serum resistance of recombinant luminescent strain *S. typhimurium* LT2 at preincubation of cells with oхoC6-AHL was found. This is provided by virulent gene activation, including *rck*; this was shown by using strain *S. typhimurium* LT2, which carries plasmid with *rck::luxCDABE* fusion.

### МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ГНОЙНО-НЕКРОТИЧЕСКИХ ОСЛОЖНЕНИЙ САХАРНОГО ДИАБЕТА

Злакоманова О. Н., Широкова М. В., Чукичев А. В.

ГБОУ ВПО Южно-Уральский государственный медицинский университет  
Минздрава России, Челябинск, Россия

Изучена динамика изменений спектра микробного пейзажа гнойно-некротических очагов пациентов с осложненным течением сахарного диабета. При повторной госпитализации у пациентов с СДС из очага тканевой деструкции высеваются «проблемные» штаммы возбудителей (*P. aeruginosa*, *A. baumannii*, MRSA), которые отличаются выраженной резистентностью ко многим антибиотикам.

**Ключевые слова:** сахарный диабет, осложнения, микробные пейзаж, антибиотики.

**Актуальность.** Сахарный диабет в настоящий момент приобрел масштабы эпидемии, а высокий риск развития хронических осложнений заболевания является серьезным вызовом, как для медицинского сообщества, так и человечества в целом. По данным Международной федерации диабета (IDF), число заре-

гистрированных людей с сахарным диабетом в возрасте 20-79 лет превысило 250 млн., лиц с нарушенной толерантностью к глюкозе – более 310 млн. Инфекционные осложнения являются одной из важнейших проблем у пациентов, страдающих сахарным диабетом. Несмотря на значительные достижения в анти-



биотикотерапии хирургических инфекций, инфекции стоп на фоне сахарного диабета остаются состояниями, угрожающими потерей конечности и обуславливающими высокую летальность [1].

Среди множества лекарственных препаратов, применяемых в лечении гнойно-воспалительных осложнений сахарного диабета, антибиотики занимают ведущее место. Интенсивное использование антибактериальных препаратов способствует росту устойчивости возбудителей инфекций к антибиотикам, что значительно снижает результаты этиотропной терапии. Нерациональная антибиотикотерапия является причиной многократных госпитализаций, в связи с отягощением инфекционного процесса и изменением видового состава микроорганизмов [2]. В 20–50% случаев причиной ампутаций является присоединившаяся инфекция, обусловленная наличием у больных с синдромом диабетической стопы (СДС) нозокомиальной, полирезистентной флоры: *Ps.aeruginosa*, MRSA.

**Целью** настоящего исследования являлось изучение динамики изменений спектра микробного пейзажа гнойно-некротических очагов пациентов с осложненным течением сахарного диабета.

**Материалы и методы.** Нами проанализированы результаты лечения 94 больных сахарным диабетом с СДС, находившимися в хирургическом отделении НУЗ ДКБ в период с 2006 по 2010 гг. Мужчин среди них было 37,3%, женщин – 62,7%. Средний возраст больных составил 62,6±1,4 года. Пациентов с сахарным диабетом (СД) I типа зарегистрировано 13,8% (13), с СД II типа – 86,2% (81). Тяжелой степенью СД (классификация ВОЗ) страдали более половины больных (55,3%), а средней степенью – 39,4%. Легкая степень диагностирована лишь у 5,3% пациентов. Среди сопутствующих заболеваний у больных отмечались атеросклероз, ИБС, хронический бронхит, ожирение и др. Нейропатическая форма синдрома диабетической стопы была диагностирована у 45,7% пациентов, нейроишемическая форма – у 54,3% больных. У больных мы наблюдали следующие клинические формы СДС: рана – 23,6%, язва – 25%, сухая гангрена – 9,6%, влажная гангрена – 13,8%, флегмона – 9,5% абсцесс – 3%, остеомиелит – 15,5%. Средняя продолжительность госпитализации 21,4 койко-дня.

У 29 (30%) впервые поступивших пациентов с СДС лечение проводилось консервативными методами, которые включали локальное применение антисептиков и физиолечение. Медикаментозная терапия включала препараты, улучшающие микроциркуляцию и антибиотики. 70% (65 первично госпитализированных пациентов) нуждались в хирургическом лечении. У 46 из них (49,8%) выполнены вскрытие гнойного очага и некрэктомия. Прогрессирующая гнойно-некротическая деструкция тканей у 19 пациентов с СДС явилась показанием для ампутации конечности. Из них у 11 (57,9%) произведено усечение нижней конечности на уровне бедра, а у 8 (42,1%) – на уровне голени. Все больные получали антибактериальную терапию широкого спектра действия. Бактериологическое исследование раневого отделяемого проводилось до применения антибиотиков. Отсутствие положительного бактериального посева являлось критерием исключения.

**Результаты и обсуждение.** Посевы раневого содержимого из гнойно-некротической раны были проведены при поступлении у всех первично поступивших больных с СДС (85 пациентов) и у 9 повторно госпитализированных пациентов. Всего выделено 25 штаммов бактерий. Монокультура идентифицирована в 61% случаев. Среди аэробных возбудителей наиболее часто в ране выделялся *Staphylococcus aureus* (43,6%). (2%). Представители семейства *Enterobacteriaceae* (*Enterobacter*, *Enterobacter faecalis*, *aerogenes*, *cloacae*, *durans*, *Enterococcus*, *Enterococcus faecalis*) в совокупности встречались в 28,7% случаев, в половине наблюдений возбудителем гнойно-некротического процесса был *Enterococcus faecalis*. Значительно реже высевались *Pseudomonas aeruginosa* (9,6%), *St. epidermidis* (5%), *Proteus* spp. (2%) и *E.coli* 2%. *Str. pyogenes*, *Str. agalactie*, *Morganella morganii* встречались менее чем в 1%.

Ассоциация различных бактерий наблюдалась в 39% случаев. При этом в качестве сопутствующей микрофлоры выделялись *Bacillus* spp., *Corynebacter* spp, *Str.haemolyticus*, *Klebsiella pneumonia*, *Actinebacter*, *Citrobacters*, В-гемолитический стрептококк, *Acinetobacter lwoffii*, *Harnia* и *Corynebacterium*, концентрация которых не превышала 10<sup>4</sup> КОЕ/мл.

У всех выделенных штаммов была исследована резистентность к антибиотикам. *S.aureus* был устойчив к оксациллину были в 11% слу-

чаев и обладал высокой чувствительностью к ванкомицину. Резистентность *P. aeruginosa* к амикацину составила 27% и к цiproфлоксацину – 33%. Для представителей семейства *Enterobacteriaceae* была характерна высокая чувствительность к амоксициллину, ампициллину, кларитромицину, цефтриаксону и цефепиму (95,4–100%), и несколько менее выраженная к меропенему (78%). Полирезистентность к двум и более антибиотикам наблюдалась в 9% случаев.

При повторной госпитализации у пациентов с СДС мы наблюдали изменение спектра бактериальной флоры в очаге деструкции. В 26% случаев из раны высевался MRSA, что могло быть обусловлено либо конкурентной контаминацией госпитального штамма, либо в вследствие его мутации в процессе антибактериальной терапии. Резко возростала число больных, у которых из раны высевалась у *P. Aeruginosa* (23%), *Klebsiella* spp. (16%) и *Proteus* spp. (12%). Кроме это было отмечено появление в ране грамотрицательных бактерий, относящийся к семейству *Moraxellaceae* – *A. Baumani* (11%).

На этом фоне наблюдался рост устойчивости высеваемой флоры к антибактериальным

препарам. Так, повышалась резистентность *S. aureus* – резистентными к оксациллину были 27%. Снижалась его чувствительность к ванкомицину (68%). Повышалась устойчивость *P. aeruginosa* к амикацину (33%) и к цiproфлоксацину (44%). Возбудители семейства *Enterobacteriaceae* сохраняли высокую чувствительность только к цефепиму (86%) и меропенему (72%). Полирезистентность к нескольким антибиотикам возростала (21% случаев).

Таким образом, при повторных госпитализациях микрофлора очага деструкции у пациентов СДС характеризуется появлением «проблемных» штаммы возбудителей (*P. aeruginosa*, *A. baumani*, MRSA), которые отличаются выраженной резистентностью ко многим антибиотикам.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Анциферов М. Б., Комелягина Е. Ю. Синдром диабетической стопы: диагностика, лечение и профилактика. – М.: МИА, 2013. – 304 с.
2. Привольнев В. В., Решедько Г. К., Савкин В. А. // Клинич. микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2009 – Т. 11, № 1. – С. 86-89.

### MICROBIOLOGICAL ASPECTS OF THE PIO-NECROTIC COMPLICATIONS SUGAR DIABETES

Zlakomanova O. N., Shirobokova M. V., Chukichev A. V.

GBOU VPO South Ural State Medical Universiti of Health of Russia,  
Chelyabinsk, Russia

Investigate dynamics changes microbial landscapes pyo-necrotic pockets from patients with complicated over sugar diabetes. When rehospitalization the patients from hearth destruction sowing «problems» strains causative agents (*P. aeruginosa*, *A. baumani*, MRSA), with the expressed resistance to many antibiotics.

*Key words:* sugar diabet, complications, microbial landscape, a antibiotics.

## ЛОКАЛЬНЫЕ АНТИМИКРОБНЫЕ ФАКТОРЫ И ЦИТОКИНЫ ПРИ ДИСБИОЗЕ КИШЕЧНИКА ЧЕЛОВЕКА

Иванова Е. В., Бондаренко Т. А., Чайникова И. Н., Перунова Н. Б.

ФГБУН Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН,  
Оренбург, Россия

В работе представлены данные о многократном увеличении уровня лактоферрина и двукратном повышении лизоцима в копрофильтратах у всех лиц с дисбиозом толстого кишечника 3 степени, по сравнению с эубиозом и дисбиозом 1, 2 степени. Про- (INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ) и противовоспалительные цитокины (IL-10) выявлялись в копрофильтратах только у лиц с дисбиозом, особенно при дисбиозе 3 степени (10–33% обследуемых). Обсуждаются возможные механизмы таких изменений и значимость их как маркеров дисбиоза толстого кишечника. Обнаружение высокого уровня лактоферрина в копрофильтратах людей, обследуемых на дисбиоз, при отсутствии инфекции, может рассматриваться как маркер выраженного дисбиоза.

*Ключевые слова:* дисбиоз, копрофильтраты, цитокины, лактоферрин, лизоцим.

**Актуальность и цель работы.** Взаимоотношения симбиотической микрофлоры кишечника и факторов врожденного иммунитета во многом определяют эффективность антимикробной защиты данного биотопа человека. Прямое или опосредованное воздействие на микроорганизмы могут оказывать белковые компоненты врожденного иммунитета, включая лактоферрин (ЛФ), лизоцим и цитокины [1]. Установлено, что многие антимикробные белки, имея различное происхождение, структуру, обладают рядом общих лигандов, сходным механизмом фиксации, что обеспечивает синергидный антимикробный эффект [2]. Комменсальная кишечная микрофлора, ее компоненты и метаболиты, взаимодействуя с образраспознающими рецепторами, анимикробными молекулами, выполняет регуляторную роль в осуществлении физиологических процессов в организме, в поддержании баланса цитокинов и микробицидных веществ [3–5]. Учитывая возможность синергидного эффекта ЛФ с лизоцимом и иммунорегуляторную роль цитокинов, актуальным представляется изучение локальных факторов врожденного иммунитета в зависимости от микробиологического состояния толстого кишечника, что позволит оценить физиологическое состояние биотопа и выявить маркеры дисбиоза.

**Целью** настоящей работы являлось изучение в копрофильтратах уровня лактоферрина, лизоцима, про- и противовоспалительных цитокинов при дисбиозе толстого кишечника человека.

**Материалы и методы.** Исследование 45 микробиоценозов кишечника от клинически здоровых людей осуществлялось общепринятыми методами. Копрофильтраты готовили с использованием ингибиторов протеаз: ингибитор соевых бобов, контрикал. Определение про- (INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ) и противовоспалительных цитокинов (IL-10), ЛФ в копрофильтратах проводилось методом ИФА с использованием реагентов «Вектор-Бест» (Россия). Лизоцим в копрофильтратах определяли фотометрическим методом с ацетонированным микрококком.

Статистическую обработку полученных данных проводили средствами пакета Statistica 10 (StatSoft, USA) с оценкой различий между средними величинами по  $t$ -критерию Стьюдента. Статистические результаты выражали в виде медианы (Me), нижних (Q25) и верхних (Q75) квартилей. Уровни статистической значимости различий определяли с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни. Различия считались статистически достоверными при  $p < 0,05$ .

**Результаты и обсуждение.** В копрофильтрах обследуемых людей, у которых бактериологически подтверждался эубиоз, уровень ЛФ составлял  $154 \pm 22$  нг/мл, лизоцима –  $1,40 \pm 0,25$  мг/мл, количественные значения цитокинов были ниже порога чувствительности наборов ИФА. При дисбиозе 1 степени в копрофильтрах отмечалось увеличение содержания ЛФ ( $239 [141,3-585,3]$  нг/мл,  $p < 0,05$ ) по сравнению с эубиозом. Существенных изменений уровня лизоцима у обследуемых данной группы не выявлялось ( $1,55 [1,42-1,81]$  мг/мл,  $p > 0,05$ ).

Следует отметить, что у 31,5% обследуемых с дисбиозом 1 степени в копрофильтрах выявлялись провоспалительные цитокины: концентрация  $INF-\gamma$  изменялась в диапазоне  $4,53-6,59$  пг/мл,  $TNF-\alpha$  –  $0,3-3,2$  пг/мл. Дисбиоз 2 степени сопровождался двукратным нарастанием в копрофильтрах количества лактоферрина по сравнению с дисбиозом 1 степени ( $479 [277-1427]$  нг/мл,  $p < 0,05$ ). Хотя увеличение концентрации лизоцима в исследуемом материале было несущественным, среди обследуемых лиц данной группы увеличивалась доля с высоким содержанием лизоцима. Провоспалительные цитокины определялись в копрофильтрах у  $42,9 \pm 2,01\%$  обследуемых, и у  $21 \pm 2,3\%$  выявлялся противовоспалительный цитокин  $IL-10$ . Количество  $INF-\gamma$  изменялось в диапазоне  $5,24-15,4$  пг/мл,  $TNF-\alpha$  –  $0,6-6,19$  пг/мл и  $IL-10$  –  $2,37-4,52$  пг/мл. При глубоких нарушениях в микросимбиозе толстого кишечника, соответствующих 3 степени дисбиоза, по сравнению с дисбиозом 1-2 степени, отмечался многократный рост в копрофильтрах ЛФ ( $1913 [1335-4929]$  нг/мл,  $p < 0,05$ ) и двукратный рост лизоцима ( $3,13 [1,84-5,0]$  мкг/мл,  $p < 0,05$ ). Не выявлено существенных различий в уровнях  $TNF-\alpha$  и  $IL-10$  по сравнению со 2-й степенью дисбиоза, за исключением шестикратного роста количества  $INF-\gamma$ .

Таким образом, выявлено однонаправленное изменение содержания в копрофильтрах антимикробных факторов и провоспалительных цитокинов по мере нарастания нарушений в микросимбиозе толстого кишечника человека. Оценивая полученные результаты, следует учитывать, что наиболее высокий уровень исследуемых факторов наблюдался при 3 степени дисбиоза, сопровождающейся гиперколонизацией условно-патогенными микроорганизмами (УПМ) и возрастанием у них значений персистентных характеристик: антилизоцим-

ной, антилактоферриновой активности [1]. Как известно, защитные эффекты ЛФ связаны с блокированием жизнедеятельности микроорганизмов посредством связывания железа; взаимодействием с липополисахаридами бактерий и предотвращением проникновения эндотоксинов в клетку; повреждением мембраны грамположительных бактерий с помощью электростатических и гидрофобных взаимодействий; ингибированием адгезии патогенных и УПМ благодаря протеолитической активности ЛФ [4, 5]. Лизоцим, являясь главным катионным белком нейтрофилов, способен разрушать гликановый компонент пептидогликанового комплекса бактерий, также как и ЛФ, связывать эндотоксины, усиливать действие других защитных факторов [2]. Оба антимикробных белка обладают иммуномодулирующими свойствами, позволяющими влиять и на механизмы адаптивного иммунитета [3]. Возрастание уровня провоспалительных цитокинов в копрофильтрах обследуемых с 3 степенью дисбиоза может являться следствием массивного воздействия компонентов УПМ, интенсивно колонизирующих кишечный биотоп у людей данной группы, а также под влиянием ЛФ, осуществляющего регуляцию цитокинов через активацию фактора транскрипции  $NF-\kappa B$ , что сопровождается увеличением продукции  $TNF-\alpha$ ,  $INF-\gamma$  и  $IL-10$  [5]. Модулирующий эффект различных форм ЛФ может проявляться и в ограничении интенсивности воспаления в кишечнике. Следствием указанных эффектов ЛФ может быть ликвидация последствий повреждающего действия УПМ, восстановление локального гомеостаза или, напротив, развитие хронического воспаления с транслокацией УПМ и появлением клинических симптомов заболевания. В связи с этим очевидно, что обнаружение высокого уровня ЛФ в копрофильтрах людей, обследуемых на дисбиоз, при отсутствии инфекции может рассматриваться как маркер выраженного дисбиоза.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бухарин О. В. и соавт. Екатеринбург, 2014. 260с.
2. Кокряков В. Н. Изд-во Наука, Санкт-Петербург 2006. 264 с.
3. Пинегин Б. В., Карсонова М. И. Иммунология 2010, 5, 246-254.
4. Berlutti F., Pantanella F., Natalizi T. et al. Molecules 2011, 16 (8), 6992-7018.
5. Legrand D. et al. Cell Mol Life Sci 2005, 62, 2549-2559.

## LOCAL ANTIMICROBIAL AGENTS AND CYTOKINES IN HUMAN INTESTINAL DYSBIOSIS

Ivanova E. V., Bondarenko T. A., Chainikova I. N., Perunova N. B.

*Institute for Cellular and Intracellular Symbiosis, UrD RAS, Orenburg, Russia*

The paper presents data on the multiplication of the level of lactoferrin and twofold increase of lysozyme in coprofiltrates in all persons with dysbiosis of the colon of 3 degree, compared with eubios and dysbiosis of 1, 2 degrees. Pro- (INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ) and anti-inflammatory cytokines (IL-10) were detected in coprofiltrates only in patients with dysbiosis, especially with dysbiosis of 3 degree (10–33% of surveyed). Possible mechanisms of such changes and the significance of their importance as the markers of their colon dysbiosis are discussed. Detection of high levels of lactoferrin in coprofiltrates from people surveyed for dysbiosis, in the absence of infection, can be considered as a marker of marked dysbiosis.

---

---

## БИФИДОБАКТЕРИИ И СИСТЕМА «ЛАКТОФЕРРИН-АНТИЛАКТОФЕРРИНОВАЯ АКТИВНОСТЬ» ПРИ ЭУБИОЗЕ И ДИСБИОЗЕ ТОЛСТОГО КИШЕЧНИКА ЧЕЛОВЕКА

Иванова Е. В.

*ФГБУН Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН,  
Оренбург, Россия*

В работе установлены различия антилактоферриновой активности (АЛФА) у бифидобактерий в зависимости от состояния микросимбиоза толстого кишечника: от 852 [568–1158] при эубиозе до 274 [148–399] нг/мл ( $p < 0,05$ ) при дисбиозе III степени. Изменения АЛФА бифидобактерий сопровождались увеличением уровня лактоферрина (ЛФ) в копрофильтратах от  $154 \pm 22$  (в норме) до 1913 [1335–4929] нг/мл (дисбиоз III степени) ( $p < 0,05$ ). Установленная обратная связь количества ЛФ в копрофильтратах с АЛФА бифидобактерий может быть одной из причин снижения доминантов в биотопе толстого кишечника человека и формирования дисбиотических состояний. Обсуждается роль системы «лактоферрин – антилактоферриновая активность» в поддержании нормо- и формировании патобиоценозов и значимость персистентных свойств для нормобиоты.

*Ключевые слова:* бифидобактерии, антилактоферриновая активность, копрофильтраты, лактоферрин, дисбиоз.

**Актуальность и цель работы.** Микроорганизмы, выбирая различные стратегии – от мутуализма до паразитизма, – либо участвуют в поддержании локального гомеостаза хозяина, либо наносят вред, вызывая дисбаланс факторов врождённого иммунитета, инициируя воспаление и инфекционные поражения органов и систем человека. Поддержание баланса или формирование дисбаланса антимикробных факторов иммунитета связано со способностью микробной клетки, с одной стороны, оказывать иммунорегуляторные эф-

фекты, и с другой, – секретировать факторы персистенции, необходимые для длительного выживания в условиях макроорганизма. Накоплен фактический материал по патогенетической значимости персистенции патогенов при реализации их отношений с макроорганизмом в системе «лизоцим хозяина – антилизоцимная активность», «комплемент – антикомплементарная активность» при формировании бактерионосительства, сальмонеллёзной инфекции и воспалительных заболеваний придатков матки неспецифической этиологии [1, 2, 3].

Использование инфектологического подхода для оценки связи персистентного признака бифидобактерий с факторами естественной резистентности, позволит уточнить роль системы «лактоферрин – антилактоферриновая активность» при формировании патобиоценозов толстого кишечника и значение персистентных свойств для нормобиоты. Однако данные анализа антилактоферриновой активности у представителей нормобиоты – бифидобактерий и уровня лактоферрина в копрофильтратах в зависимости от состояния микросимбиоза толстого кишечника человека отсутствуют, что и послужило целью данного исследования.

**Материалы и методы.** Исследование микробиоценоза кишечника 97 пациентов в возрасте от 1 месяца и до 60 лет осуществлялось общепринятыми методами. Копрофильтраты готовили с использованием ингибиторов протеаз: ингибитор соевых бобов, контрикал. Антилактоферриновую активность (АЛФА) бифидобактерий и уровень лактоферрина в копрофильтратах определяли методом ИФА с использованием наборов ЗАО «Вектор-Бест» [2]. Статистическую обработку полученных данных проводили средствами пакета Statistica 10 (StatSoft, USA). Статистические результаты выражали в виде медианы (Me), нижних (Q25) и верхних (Q75) квартилей. Уровни статистической значимости различий определяли с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни. Различия считались статистически достоверными при  $p < 0,05$ .

**Результаты и обсуждение.** В результате проведенных исследований были установлены различия антилактоферриновой активности у бифидобактерий в зависимости от микробиологического состояния биотопа толстого кишечника человека. При эубиозе кишечника культуры *Bifidobacterium* sp. проявляли АЛФА в  $73 \pm 0,9\%$  случаев, выраженность признака составляла  $852 [568-1158]$  нг/мл. У штаммов бифидобактерий, изолированных при дисбиозе I степени, по сравнению с эубиотическими штаммами, распространенность признака ( $74 \pm 1,1\%$ ) не изменялась, а уровень АЛФА возрастал незначительно ( $1007 [809-1224]$  нг/мл), ( $p > 0,05$ ). Напротив, при дисбиозе II степени антилактоферриновая активность у бифидобактерий регистрировалась реже ( $у 59 \pm 1,7\%$  штаммов) и свойство снижалось до  $396 [165-453]$  нг/мл ( $p < 0,05$ ). У штаммов бифидобакте-

рий, выделенных при глубоких нарушениях в микросимбиозе толстого кишечника, соответствующих III степени дисбиоза, наблюдалась тенденция к снижению распространенности ( $у 44 \pm 2,4\%$ ) и выраженности свойства ( $274 [148-399]$  нг/мл) по сравнению со II степенью дисбиоза.

Анализ лактоферрина в копрофильтратах обследуемых людей выявил однонаправленные изменения, характеризующиеся увеличением антимикробного белка при выраженных микробиологических нарушениях в микросимбиозе толстого кишечника человека. У здоровых обследуемых, у которых бактериологически подтверждался эубиоз, уровень лактоферрина составлял  $154 \pm 22$  нг/мл. При дисбиозе I степени отмечалось увеличение содержания лактоферрина ( $239 [141,3-585,3]$  нг/мл,  $p < 0,05$ ) по сравнению с эубиозом. Дисбиоз II степени сопровождался двукратным нарастанием в копрофильтратах количества лактоферрина ( $479 [277-1427]$  нг/мл,  $p < 0,05$ ). При глубоких нарушениях в микросимбиозе толстого кишечника (III степень дисбиоза), отмечался многократный рост лактоферрина ( $1913 [1335-4929]$  нг/мл,  $p < 0,05$ ) в копрофильтратах. Таким образом, была установлена обратная связь количества лактоферрина с антилактоферриновой активностью бифидобактерий, что может быть одной из причин снижения доминантов при формировании дисбиотических состояний толстого кишечника человека.

Полученные данные о динамике антилактоферриновой активности бифидобактерий и уровня лактоферрина в копрофильтратах подтверждают роль системы «лактоферрин – антилактоферриновая активность» в поддержании нормо- и формировании патобиоценозов, не только репродуктивного тракта [4], но толстого кишечника человека. Лактоферрин рассматривают как алармин-эндогенный активатор врожденного иммунитета, реализующий уже на ранних этапах контакта эритроцитов с микроорганизмами различные механизмы (конкуренция за железо, мембраноповреждающий эффект, ингибирование адгезии бактерий, иммунорегуляторная роль) защиты биотопа толстого кишечника человека [5]. Снижение способности бифидобактерий изменять уровень лактоферрина в среде при дисбиозе 2-3 степени, который характеризуется уменьшением количества

доминантов (бифидобактерий) микросимбиоза толстого кишечника, увеличением числа условно-патогенных микросимбионтов и возрастание у них персистентных характеристик, сопровождается значительным возрастанием концентрации в копрофильтратах лактоферрина – локального антимикробного фактора. Все это не позволяет рассматривать персистентный потенциал доминантных представителей микробиоты как патогенетическую основу данного явления, так как для бифидобактерий персистенция прежде всего один из адаптационных механизмов в условиях биотопа, необходимый для сохранения жизнедеятельности прокариота и реализации важных регуляторных функций. С другой стороны, умеренный уровень персистентных

характеристик бифидобактерий при эубиозе не приводит к значительной деградации факторов неспецифической резистентности хозяина, а наоборот, может способствовать регуляции и стабилизации необходимого уровня лактоферрина, одного из универсальных факторов антимикробной защиты.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бухарин О. В. и соавт. Екатеринбург, 1999. 366 с.
2. Константинова О. Д. Автореф. дис. ... док. мед. наук. Оренбург, 2004.
3. Чайникова И. Н. и соавт. Медицинская иммунология 2008, 1, 35-42.
4. Глухова Е. В. Автореф. дис. ... канд. мед. наук. Оренбург, 2009.
5. Legrand D. et al. Cell Mol Life Sci 2005, 62, 2549-2559.

### BIFIDIBACTERIA AND "LACTOFERRIN-ANTILACTOFERRIN ACTIVITY" SYSTEM IN EUBIOSIS AND DYSBIOSIS OF HUMAN COLON

Ivanova E. V.

*Institute for Cellular and Intracellular Symbiosis, RAS, Orenburg, Russia*

In this paper we established the differences in antilactoferrin activity (ALfA) of bifidobacteria between the states of the human colon microsymbiocoenosis: from 852 [568–1158] at the eubiosis to 274 [148–399] ng/ml ( $p < 0,05$ ) at the third degree of dysbiosis. Changes of the bifidobacterial ALfA was accompanied by an increase of lactoferrin (LF) level in coprofiltrates from  $154 \pm 22$  (normal) to 1913 [1335–4929] ng/ml (at the third degree of dysbiosis), ( $p < 0,05$ ). Determined feedback of LF concentration in coprofiltrates and bifidobacterial ALfA can be one of the reasons of decreasing the dominant bacteria number in human colon biotope and in dysbiotic state formation. The role of "lactoferrin – antilactoferrin activity" in the maintenance of normocoenosis and in the establishing of pathobiocoenosis in human colon is discussed as well as the significance of persistent features for normobiota.

## ЛЕКТИН MTL КАК ФАКТОР СИСТЕМЫ ЗАЩИТЫ МИДИИ *MYTILUS TROSSULUS*

Литовченко А. П.<sup>1</sup>, Чикаловец И. В.<sup>1,2</sup>, Мизгина Т. О.<sup>1</sup>,  
Молчанова В. И.<sup>2</sup>, Черников О. В.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ФГАОУ ВПО Дальневосточный федеральный университет; <sup>2</sup>ФГБУН  
Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г. Б. Елякова ДВО РАН,  
Владивосток, Россия

Определено содержание лектина из мидии *Mytilus trossulus* в различных органах моллюска. Изучено изменение уровня лектина в экстракте мантии в ответ на заражение мидии дрожжами *Pichia pastoris* и бактериями *Vibrio proteolyticus*. Показано, что лектин агглютинирует микроорганизмы, взаимодействуя с их клеточной поверхностью через углевод-связывающий домен.

**Ключевые слова:** лектин, мидия, заражение, агглютинирующая активность, углевод-связывающий домен.

**Актуальность и цель работы.** Лектины – углевод-связывающие белки или гликопротеины, специфически и обратимо взаимодействующие с моно-, олиго-, полисахаридами и гликоконъюгатами, заняли достойное место в сравнительной иммунологии [1].

Существование огромного числа и разнообразия беспозвоночных свидетельствует о наличии у них эффективных систем защиты собственного организма. Показано, что лектины морских беспозвоночных играют важную роль в таких неспецифических иммунных реакциях, как агглютинация, опсонизация, фагоцитоз и лизис, и способны избирательно агглютинировать грамположительные и грамотрицательные бактерии [2]. Ранее было показано изменение содержания лектинов в мантии мидии *Mytilus trossulus* в ответ на действие антропогенных загрязняющих веществ [3]. Позднее из мантии этой мидии был выделен и частично охарактеризован Gal/GalNAc-специфичный лектин MTL [4].

**Целью** исследования было определение функциональной роли MTL в организме моллюска.

**Материалы и методы.** Для изучения распределения лектина по органам мидии были получены антитела против MTL и разработан метод иммуноферментного анализа (ИФА). Экстракты органов и клеток моллюска (мантия, мускул, гепатопанкреас, жабры, гонады,

гемоциты) были приготовлены, как описано в работе [4].

Для измерения уровня лектина в ответ на заражение мидии дрожжами и бактериями отобрали 75 мидий и поместили в аквариумы для акклиматизации при постоянной температуре 18 °С и солености воды 32‰ в течение 4 суток. Контрольную группу мидий (25 особей) иммунизировали PBS. Первую опытную группу (25 особей) иммунизировали суспензией дрожжей *P. pastoris*, разведенных стерильным раствором PBS до ОП<sub>600</sub> = 0,4. Вторую опытную группу (25 особей) иммунизировали аналогично, суспензией бактерий *V. proteolyticus*. По 4 особи из каждой группы анализировали через 0, 0,5, 3, 6, 12 и 24 часа. В исследуемых образцах брали мантию, готовили из нее экстракт, центрифугировали. В полученном супернатанте определяли уровень активности лектина методом гемагглютинации (ГА). Реакцию гемагглютинации проводили, как описано [3].

Для изучения взаимодействия MTL с *P. pastoris* и *V. proteolyticus* микроорганизмы были помечены флуоресцентной меткой – FITC. Агглютинацию лектином дрожжей и бактерий регистрировали с помощью флуоресцентного микроскопа. Для выяснения характера связывания MTL с микроорганизмами проводили ингибирование агглютинации моносахаридами – галактозой и глюкозой.



**Результаты.** Для выяснения роли МТЛ в организме мидии мы определили содержание лектина в различных органах и клетках моллюска методом ИФА. Наибольшее содержание лектина обнаружено в мантии мидии. Уровень МТЛ в мантии в 33 раза больше, чем в гонадах и в 55 раз больше чем в гемоцитах. В остальных органах содержание лектина незначительно по сравнению с содержанием в мантии. Такие же результаты были получены при определении уровня лектина в органах другого двустворчатого моллюска *Venerupis philippinarum* [5]. Большое содержание лектина в мантии можно объяснить тем, что при попадании чужеродных агентов в организм мидии лектин мантии одним из первых контактирует с морской водой и препятствует их распространению по организму, выполняя, таким образом, защитную функцию.

В процессе эксперимента по заражению мидии дрожжами *P. pastoris* и бактериями *V. proteolyticus* через 30 минут после иммунизации титр лектина резко снижался. По всей вероятности, это связано с быстрым расщеплением молекул лектина в ходе ответа на антиген и его удаление. Через 3 часа после иммунизации концентрация лектина возрастала в 2,5 раза, вероятно, в результате активации процесса его синтеза и механизма секреции. Через 6 часов, по мере удаления антигена из организма, в группе, зараженных *P. pastoris*, концентрация лектина уменьшалась и постепенно возвращалась к исходному уровню. В группе, иммунизированной бактериями, высокий уровень лектина держался гораздо дольше и только к 24 часам возвращался к исходному уровню. Возможно, это связано с различием в строении их клеточных стенок, соответственно с реакцией лектина на разные антигены.

В контрольной группе животных также отмечались небольшие колебания в титре ГА, что, вероятно, обусловлено ответом на травму при иммунизации. Интересно отметить, что спад лектинной активности в этой группе наблюдался только через 3 часа, т.е. лектин при физической травме начинает работать позже, чем при микробиальном заражении.

Чтобы понять характер взаимодействия МТЛ с микроорганизмами, мы изучили агглютинацию лектином дрожжей и бактерий, меченных флуоресцентной меткой.

Полученные результаты показали, что лектин связывается с клеточной поверхностью микроорганизмов, агглютинируя их. В присутствии галактозы, специфичного для лектина моносахарида, наблюдалось ингибирование агглютинации, в то время как глюкоза не оказывала никакого влияния на связь лектина с клеткой.

Таким образом, можно сделать вывод о том, что МТЛ взаимодействует с микроорганизмами по углевод-связывающему домену. На основании полученных результатов можно предположить, что МТЛ является компонентом иммунной системы мидии и участвует в защите организма беспозвоночного от воздействия внешних патогенов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lis H., Sharon N. Chem Rev 1998, 98, 637-674.
2. Черников О.В., Чикаловец И.В., Молчанова В.И., Кондрашина А.С., Ли В., Лукьянов П.А. Биохимия 2013, 78, 977-989.
3. Чикаловец И.В., Черников О.В., Шехова Е.А., Молчанова В.И., Лукьянов П.А. Биология моря 2010, 36, 70-74.
4. Чикаловец И.В., Кондрашина А.С., Черников О.В., Молчанова В.И., Лукьянов П.А. Хим природ соед 2012, 6, 933-936.
5. Li C., Yu S., Zhao J., Su X., Li T. Fish and Shellf Immun 2011, 30, 1202-1206.

### LECTIN MTL AS THE DEFENSE SYSTEM FACTOR OF MUSSEL *MYTILUS TROSSULUS*

Litovchenko A. P.<sup>1</sup>, Chikalovets I. V.<sup>1,2</sup>, Mizgina T. O.<sup>1</sup>,  
Molchanova V. I.<sup>2</sup>, Chernikov O. V.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>FSAEI HPE Far Eastern Federal University; <sup>2</sup>G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry FEB RAS, Vladivostok, Russia

The lectin content from the mussel *Mytilus trossulus* in various organs of mollusk was determined. The change of the lectin level in extract of the mantle was studied in response to infection of a mussel by yeast *Pichia pastoris* and bacteria *Vibrio proteolyticus*. It is shown that lectin agglutinates microorganisms by interacting with their cell surface through the carbohydrate-binding domain.

## ОКИСЛИТЕЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛОВ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ СУПЕРНАТАНТОВ СМЕШАННЫХ КУЛЬТУР *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* И *ESCHERICHIA COLI*

Масленникова И. Л., Кузнецова М. В., Некрасова И. В.

ИЭГМ УрО РАН, Пермь, Россия

Изучено влияние супернатантов культур *Pseudomonas aeruginosa* и *Escherichia coli* на спонтанный и стимулированный уровень продукции активных форм кислорода (АФК) нейтрофилами. Спонтанная продукция АФК была ниже у нейтрофилов, предобработанных супернатантом *E. coli* по сравнению с моновидовыми супернатантами всех штаммов *P. aeruginosa*. Уровень стимулированной люминол-зависимой хемилюминесценции был выше в случае воздействия супернатантов штаммов *P. aeruginosa* ATCC и 9-3 (преимущественная планктонная форма существования). Присутствие ассоцианта *E. coli* в составе микробного сообщества ослабляло окислительную активность нейтрофилов.

**Ключевые слова:** *P. aeruginosa*, *E. coli*, супернатанты, нейтрофилы, окислительная активность.

**Введение.** Известно, что неспецифический иммунный ответ на бактериальные инфекции первоначально опосредуется полиморфноядерными лейкоцитами крови, основные функции которых связаны с уничтожением микроорганизмов. Активация НАДФН-оксидазы плазматической мембраны обеспечивает «респираторный взрыв» – избыточное образование супероксидного радикала, что является, с одной стороны, механизмом бактерицидной активности, с другой, – патогенетическим фактором.

Полиэтиологичные инфекции, обусловленные ассоциацией *Pseudomonas aeruginosa* и *Escherichia coli*, доминируют в моче и раневом содержимом. Секретируемые экзосометаболиты *P. aeruginosa* (пиоцианин, экзополисахариды, липополисахариды, аутоиндукторы) [1,2] и *E. coli* (липополисахариды и др.) [3] даже в отсутствие контакта бактерий с нейтрофилами могут оказывать влияние на функции последних. Продукция экзосометаболитов в смешанной культуре определяется характером взаимоотношений бактерий и преимущественной формой их существования (биофильной или планктонной), что может влиять на окислительную активность нейтрофилов и исход воспаления.

**Цель работы:** изучить влияние супернатантов смешанных культур *P. aeruginosa* и *E. coli*

на общую продукцию активных форм кислорода (АФК) нейтрофилами.

**Материалы и методы.** Референтный штамм *P. aeruginosa* ATCC 27853 (F-51) (National Collection of Dairy Cultures, США), клинические штаммы *P. aeruginosa* БАЛЖ, 9-3 и штамм *E. coli* K12 TG1 pF1 lux<sup>+</sup> Ap<sup>r</sup> [4] выращивали на среде LB («Sigma», США) при 37°C, 18-20 ч в моновидовой и смешанной культуре. Внеклеточные супернатанты получали путем фильтрации (диаметр пор – 0.2 мкм, «Хийу Калур», Эстония).

В работе использовали фракционированные в двойном градиенте плотности фикола-урографина нейтрофилы периферической крови здоровых мужчин в возрасте от 19 до 39 лет (n=8). К 300 мкл суспензии нейтрофилов (10<sup>7</sup> кл/мл) в среде RPMI («Биолот», Россия) добавляли 500 мкл супернатантов моновидовых и смешанных культур и инкубировали при 37°C в течение 60 мин. Контролем служила среда RPMI. Затем нейтрофилы отмывали от супернатантов и ресуспендировали в среде Хенкса.

Спонтанный уровень люминолзависимой хемилюминесценции (ЛЗХЛ) предобработанных нейтрофилов определяли в смеси 180 мкл люминола (1мМ), 20 мкл нейтрофилов (10<sup>6</sup> кл/мл), 40 мкл р-ра Хенкса. Стимулированный уровень ЛЗХЛ предобрабо-

танных нейтрофилов определяли в смеси 180 мкл люминола (1мМ), 20 мкл нейтрофилов ( $10^6$  кл/мл), 20 мкл бактерий *E. coli* K12 ( $10^7$  кл/мл), 20 мкл 50% пула сывороток в течение 60 мин на мультипланшетном ридере Synergy H1 («BioТес», США).

Количество пиоцианина измеряли по оптической плотности при 695 нм, пиовердина – по флуоресценции при длине волны возбуждающего излучения 400 нм, детектируемого излучения – 460 нм на мультипланшетном ридере Synergy H1 («BioТес», США). Количество экзополисахарида определяли кислотно-фенольным методом.

**Результаты.** Изучено влияние супернатантов культур *P. aeruginosa* и *E. coli* на спонтанный и стимулированный уровень продукции активных форм кислорода нейтрофилами. Установлено, что спонтанная ЛЗХЛ не отличалась у всех супернатантов от контроля. Однако отмечено, что продукция АФК была ниже у нейтрофилов, предобработанных супернатантом *E. coli* по сравнению с моновидовыми супернатантами всех штаммов *P. aeruginosa*.

Уровень стимулированной опсонизированными бактериями ЛЗХЛ был выше, чем спонтанный у всех вариантов супернатантов. При воздействии моновидовых и смешанных супернатантов *P. aeruginosa* и *E. coli* наблюдалась меньшая продукция АФК по сравнению с RPMI. В случае воздействия супернатантов штаммов *P. aeruginosa* ATCC и 9-3 (преимуще-

ственная планктонная форма существования) уровень ЛЗХЛ был выше, чем у супернатантов *E. coli* и смешанных культур. Супернатанты *P. aeruginosa* БАЛЖ не отличались по воздействию от *E. coli*.

Содержание пиоцианина в супернатантах *P. aeruginosa* было низким (0.2-5.2 мкМ). Количество пиовердина в составе смешанных культур было меньше, чем у моновидовых (*P. aeruginosa* ATCC – 299/275, у *P. aeruginosa* БАЛЖ – 1243/898, у *P. aeruginosa* 9-3 – 326/348 усл. ед. соответственно). Отмечена положительная корреляция между уровнем стимулированной ЛЗХЛ и содержанием в моновидовых супернатантах пиоцианина и экзополисахаридов, а в смешанных супернатантах – ЛПС.

Таким образом, экзометаболиты ассоцианта *E. coli* в составе микробного сообщества ослабляли окислительную активность нейтрофилов по сравнению с моновидовой культурой *P. aeruginosa*.

Работа поддержана грантом РФФИ № 14-04-01300.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hooi D., Bycroft B., Chhabra S. et al. Infect Immunity 2004, 72 (11), 6463-6470.
2. Pier G. B. Int. J. Med. Microbiol. 2007, 297, 277-295.
3. Berezow A. B., Ernst R. K., Coats S. R. et al. Microb Pathog. 2009, 47 (2), 68-77.
4. Данилов В. С., Зарубина А. П., Ерошникова Г. Е. и др. Вестник МГУ. Биология 2002, 3, 20-24.

### OXIDATIVE ACTIVITY OF NEUTROPHILS UNDER EXPOSURE OF MIXED CULTURE SUPERNATANTS OF *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* AND *ESCHERICHIA COLI*

Maslennikova I. L., Kuznetsova M. V., Nekrasova I. V.

IEGM UB RAS, Perm, Russia

The influence of *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* supernatants on the spontaneous and stimulated levels of reactive oxygen species (ROS) production by neutrophils was studied. Spontaneous ROS production was lower in neutrophils pretreated with *E. coli* supernatant compared to monospecies ones of *P. aeruginosa*. The level of stimulated luminol-dependent chemiluminescence was higher in the case of exposure to supernatants of *P. aeruginosa* ATCC and 9-3 (planktonic form of existence). The presence of *E. coli* associates as part of the microbial community weakened the oxidative activity of neutrophils.

## ОСОБЕННОСТИ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ ГЕНИТАЛЬНОЙ ГОНОКОККОВОЙ ИНФЕКЦИИ

Румянцева М. А., Карпунина Т. И.

ГБОУ ВПО ПГМУ им. академика Е. А. Вагнера Минзсрава РФ,  
Пермь, Россия

Показано, что информативность бактериоскопического и бактериологического методов исследования существенно различается при обследовании мужчин и женщин с острой гонореей. Однако совершенствование микробиологического мониторинга гонококковой инфекции требует внедрения дополнительных тестов для типирования возбудителей.

*Ключевые слова:* гонококки, фенотипические признаки, морфология клеток и колоний.

**Актуальность и цель работы.** *Neisseria gonorrhoeae* вызывает урогенитальные, фарингальные, конъюнктивальные и аноректальные инфекции, наиболее часто поражая репродуктивные органы. Хотя генитальная гонорея одно из самых знаменитых заболеваний человека, и, по образному выражению М. А. Гомберга, «болезнь с историей», ее своевременная диагностика, в особенности у женщин, остается сложной и далеко не всегда успешно решаемой задачей клинической практики. Это связано с тем, что до 95% женщин переносят заболевание в малосимптомной, а зачастую бессимптомной форме [1]. Отчасти распространению инфекции способствует отсутствие возможностей применения современных методов выявления и типирования *N. gonorrhoeae*. К настоящему времени разработана система типирования штаммов *N. gonorrhoeae*, основанная на физиологических и иммунологических характеристиках возбудителя (A/S-типирование). В основу этого подхода положено определение типа питания (ауксотипа) и серотипа возбудителя [2]. Однако в России до настоящего времени лабораторная диагностика в лучшем случае предусматривает использование традиционного бактериоскопического и культурального методов исследования [3]. Невозможность широкого применения на практике молекулярно-генетических и других высокотехнологичных тестов идентификации гонококков делает целесообразной оптимизацию рутинных тестов микробиологического анализа.

**Целью** проводимого исследования послужило сравнительное изучение информативности

бактериоскопического и бактериологического методов в диагностике острой гонореи у мужчин и женщин репродуктивного возраста.

**Материалы и методы.** Исследованы образцы биологического материала 17 мужчин (отделяемое из уретры) и 11 женщин (вагинальный секрет либо слизь из цервикального канала) с диагнозом свежая острая неосложненная гонорея нижних отделов мочеполового тракта. Для бактериоскопического исследования готовили по два препарата, один из которых после 3-х минутной фиксации 96% этанолом окрашивали метиленовым синим для выявления клеточных элементов и присутствия микроорганизмов, другой — по методу Грама, для определения тинкториальных свойств обнаруживаемых диплококков. Материал для культурального исследования собирали с помощью одноразового стерильного тампона с пластиковым или металлическим аппликатором, входящего в комплект транспортной среды Амиес (Стюарт) с активированным углем (HiMedia, Индия). В условиях лаборатории с соблюдением правил асептики тампон с образцом биологического материала извлекали из пробирки с транспортной средой и производили посев в чашки Петри на поверхность гонококкового шоколадного агара (Bio Merieux, Франция) или отечественной питательной среды, выпускаемой ФГУП НПО «Микроген» (г. Ставрополь). Посевы инкубировали в термостате при температуре 37°C и повышенной влажности в атмосфере 5-10% CO<sub>2</sub> (в эксикаторе с белой свечой). Наблюдение за ростом проводили до 7 суток с ежедневным просмотром чашек с посевами. Для про-

верки «подозрительных» колоний выполняли оксидазный тест с использованием коммерческих тест-полосок, содержащих диметилпарафенилендиамина гидрохлорид (ERBA-Lachema Diagnostika, Чехия). Морфометрические характеристики клеток и колоний получали с помощью компьютерной микроскопии с использованием установки OLYMPUS (производство Япония) при увеличениях 100x1,36x10 и 4x0,85x10 соответственно.

**Результаты.** Из фенотипических признаков для дифференцировки гонококков в практике используются самые простые, такие как морфология бактерий и колоний, ими сформированных. Бактериоскопическое исследование оказалось результативным в 100% процентах случаев изучения «мужских» мазков с выявлением типичных морфотипов с преимущественно внутриклеточной локализацией. Только в 6 из 11 образцов вагинального/цервикального отделяемого были обнаружены грамотрицательные диплококки бобовидной формы. Важно подчеркнуть, что в трех препаратах из шести отмечены различия в размерах клеток, образующих пару. Внутриклеточную локализацию возбудителей регистрировали спорадически, напротив, в полях зрения преобладали гонококки, адгезированные на эпителиальных клетках. В остальных мазках обнаруживали полиморфную флору, в том числе округлые грамотрицательные бактерии, по размерам – от мелких до гигантских.

Посев биологического материала на неселективные питательные среды позволил обнаружить колонии, «подозрительные» на гонококки (положительный оксидазный тест), во всех случаях. Посевы отделяемого из уретры мужчин характеризовались типичным единообразием сформировавшихся колоний: от 1 до 3 мм в диаметре, округлые, выпуклые, с ровным краем, бесцветные, чаще непрозрачные или слегка мутные, с блестящей поверхностью. При культивировании образцов вагинально-цервикальной слизи внешний вид колоний отличало значительное разнообразие. Морфометрические показатели колебались в пределах от 0,6 до 4,7 мм в диаметре. Более того, если формирование колоний в первом случае происходило в течение 24-48 часов, то во втором появление вновь образовавшихся колоний отмечали до 5-6-х суток. К концу периода наблюдений появлялись особенно мелкие колонии, напоминающие капли росы.

Микроскопическое исследование материала из колоний, окрашенного по Граму, в определенном смысле дополнило информацию, полученную при микроскопии нативного материала. В «мужских» мазках регистрировалась однотипная картина: компактно упакованные, особенно в центральной части, скопления грамотрицательных диплококков, что косвенно указывает на наличие у бактерий пилей и/или Ора-белка. В то же время в колониях из посевов вагинально-цервикальной слизи отмечали выраженный полиморфизм кокков, как по форме, так и по размерам. Интенсивность окраски клеток также варьировала в широких пределах. В колониях, появившихся на 5-6 сутки, отмечали очень мелкие разрозненные полиморфные бактерии, что характерно для ауксотрофных вариантов.

Таким образом, использование бактериоскопического исследования в качестве скринингового теста сохраняет свою актуальность при обследовании мужчин с клинически выраженной гонококковой инфекцией. Такой подход недопустим в отношении женщин, т.к. более 50% обратившихся с гонококковой инфекцией, будет пропущено, если бактериоскопический метод будет единственным при их обследовании на гонорею. Задача широкого внедрения бактериологического метода важна не только для диагностики генитальной гонореи у женщин, но приобретает особую актуальность в связи с глобальным ростом антибиотикорезистентности выделяемых штаммов *N. gonorrhoeae*. Однако, разная информативность рутинных методов при обследовании мужчин и женщин, лишь косвенно указывающая на принадлежность к тому или иному ауксотипу и серотипу возбудителя, лишняя раз доказывает необходимость внедрения дополнительных тестов при их бактериологическом обследовании для повышения эффективности микробиологического мониторинга гонококковой инфекции.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Mayor M. T., Roett M. A., Uduhiri K. A. American Family Physician. 2012, 86 (10), 931-938.
2. Кубанова А. А., Васильев М. М., Говорун В. М., Терман О. А., Ильина Е. Н., Припутневич Т. В. Вестник дерматологии и венерологии 2004, 1, 3-10.
3. Зиганшин О. Р., Шопова Е. Н., Ковалев Ю. Н., Долгушин И. И., Безпалько Ю. В. Гонококковая инфекция. Учебное пособие. Изд-во «Челябинская государственная медицинская академия», Челябинск, 2010.

## FEATURES OF MICROBIOLOGICAL DIAGNOSTICS OF GENITAL GONOCOCCAL INFECTION

Rumyantseva M. A., Karpunina T. I.

Academician E. A. Wagner Perm State Medical University, Perm, Russia

It is shown, that informative level of bacterioscopy and bacteriology differs significantly for the examination of men and women with acute gonorrhoea. In order to improve the microbiological monitoring of gonococcal infection we need more tests for typing these microorganisms.

## ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ИЗОЛЯТОВ БАКТЕРИЙ РОДА *AZOSPIRILLUM* НА РОСТОВЫЕ ПАРАМЕТРЫ ПРОРОСТКОВ ОГУРЦА

Смирнов К. В.<sup>1</sup>, Ремезовская Н. Б.<sup>2</sup>, Демаков В. А.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Пермский государственный национальный исследовательский университет;

<sup>2</sup>Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь, Россия

В данной работе представлено краткое описание выделения изолятов рода *Azospirillum* из почв Пермского края, а также поведена оценка влияния полученных девяти изолятов на ростовые параметры проростков огурца. Проростки получали из семян огурца, которые выдерживали в бактериальной суспензии несколько часов. На 30 сут. вегетации измерялись следующие ростовые параметры: вегетативная масса, длина корней, количество боковых корней и количество настоящих листьев. На основании сравнения данных показателей с аналогичными показателями контрольной группы растений делался вывод о влиянии изолятов на проростки. Бактериальные культуры, оказавшие положительный эффект, могут быть использованы в качестве основы для создания биопрепарата, стимулирующего развитие растений и повышающего их урожайность.

*Ключевые слова:* *Azospirillum*, азотфиксаторы, ростовые параметры, проросток.

**Актуальность и цель работы.** В последние годы растет интерес к альтернативным способам повышения урожайности сельскохозяйственных культур. К таким способам относится создание биопрепаратов на основе ризосферных бактерий [1].

Род *Azospirillum* представляет собой группу свободноживущих бактерий, влияющих на развитие растений и их урожайность, данный род принадлежит к группе бактерий, стимулирующих рост растений (PGMB – plant growth promoting bacteria) [1]. Бактерии данного рода можно выделить из 30–90% почв [2]. Однако первоначально бактерии рода *Azospirillum* были выделены из почв тропической и субтропической климатических зон [3]. В связи с этим, азоспириллы почв умеренного климата и их влияние на ростовые параметры

растений были изучены недостаточно. Кроме того, выделение новых штаммов из зон с умеренным климатом – это очередной шаг в поиске микроорганизмов, способных быть основой для создания биопрепарата, повышающего урожайность и продуктивность растений.

**Цель данного исследования** – выделить изоляты *Azospirillum* из почв Пермского района и произвести оценку влияния инокуляции этих штаммов на ростовые параметры саженцев огурцов в первые 30 сут. роста. По результатам работы можно будет судить о перспективах создания бактериального удобрения на основе выделенных изолятов.

**Материалы и методы.** Объект исследования: 9 изолятов *Azospirillum*, выделенных из почв Пермского района (57°57'05 с.ш. 56°09'55 в.д.).

**Выделение изолятов *Azospirillum*.** Сбор почвенных образцов и выделение изолятов азоспирилл происходили в соответствии с методикой, предложенной Звягинцевым [4]. Дополнительная проверка принадлежности изолятов к роду *Azospirillum* проводилась с помощью пересева колоний на среду с красителем конго красным, так как абсорбция этого красителя при росте колоний *Azospirillum* служит отличительной чертой данного рода [5].

**Исследование влияния на ростовые параметры проростков огурца.** Семена помещались в колбы, содержащие 30 мл 3-х суточных культур с количеством КОЕ  $10^5$ - $10^7$ , семена замачивались в течение 5 ч. На каждый штамм приходилось не менее 20 семян огурца. После инокуляции каждое семечко было посажено пинцетом в отдельный пластиковый стаканчик объемом 400 мл, заполненный наполовину кокосовым субстратом. В качестве контроля использовались семена, которые замачивали в стерильной среде Доберейнера. Проростки выращивались в течение 30 сут., при температуре 23-26°C, полив осуществлялся раз в 7 сут., подкормка минеральными удобрениями не проводилась. По окончании эксперимента исследовались следующие параметры: масса зеленой части саженцев, длина корней, количество настоящих листьев и количество боковых корней.

**Результаты и обсуждение.** В ходе исследования было выделено 9 изолятов бактерий рода *Azospirillum*, активно фиксирующих атмосферный азот, 7 из которых были способны к росту на среде, содержащей 3% NaCl. Обнаружено, что инокулирование семян огурца выделенными изолятами, по большей части, оказывает положительное воздействие на ростовые параметры растений. Восемь из девяти культур достоверно повышали вегетативную мас-

су проростков, при этом 5 штаммов повышали сырую надземную массу на 20-30%. Длину корней проростков повышали только четыре из девяти изолятов, причем прирост корней составлял 20-40% по сравнению с контрольными образцами. Семь из девяти изолятов достоверно увеличивали количество настоящих листьев у проростков огурца. Помимо этого, пять изолятов влияют и на количество боковых корней, число которых возросло на 10-15%. Установлено, что селекционированные изоляты положительно влияют на ростовые параметры рассады. Наиболее эффективная стимуляция развития проростков наблюдалось при инокулировании изолятами № 2, 3, 7, 9.

Таким образом, по итогам исследования были определены перспективные культуры, которые могут быть использованы при создании бактериальных удобрений и потенциально интересны для сельскохозяйственных предприятий. В дальнейшем планируется исследование влияния инокуляции изолятов на рост и урожайность растений в течение всего цикла выращивания. Кроме того, планируется оценка ростовых параметров растений при совместном внесении бактериальных культур и минеральных удобрений или гуминовых кислот.

Работа поддержана программой фундаментальных исследований УрО РАН в 2015-2017 гг., проект 15-4-4-26.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bashan Y. Can J Microbiol 2004, 50, 521-577.
2. Yu Z. Appl Environ Microbiol 2001, 67, 1565-1574.
3. Attitalla I. H. American-Eurasian J Agric Environ Sci 2010, 6, 617-625.
4. Звягинцев Д. Г. МГУ, Москва 1991, 304 с.
5. Enrique A. R. C. Appl Environ Microbiol 1982, 44, 990-991.

## ESTIMATION OF AZOSPIRILLUM STRAIN INFLUENCE ON THE CUCUMBER SEEDLINGS GROWTH PARAMETERS

Smirnov K. V.<sup>1</sup>, Remezovskaya N. B.<sup>2</sup>, Demakov V. A.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Perm State National Research University; <sup>2</sup>Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, UB RAS, Perm, Russia

This paper provides a brief description of the process of *Azospirillum* strains isolation from the soils of the Perm region, as well as the estimation of the influence of nine strains on the cucumber seedlings parameters. The seedlings were raised from the seeds inoculated with *Azospirillum* strains for several hours. On the 30th day of growth such parameters as vegetative mass, root length, the number of lateral roots and the number of real leaves were measured. Then the results were compared with the data obtained with the control group. Based on this comparison, it can be concluded that the isolated strains influence the plant growth. Strains, which showed good results, can be used for manufacturing the biofertilizers.

## РЕГУЛЯЦИЯ АНТИЛИЗОЦИМНОЙ АКТИВНОСТИ БАКТЕРИЙ АНТИМИКРОБНЫМИ ПЕПТИДАМИ ИЗ ТРОМБОЦИТОВ КУР

Сычева М. В.<sup>1,2</sup>, Рогожин Е. А.<sup>3</sup>, Пашкова Т. М.<sup>1</sup>,  
Пешкова Ю. И.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН, Оренбург;

<sup>2</sup>Оренбургский государственный аграрный университет, Оренбург;

<sup>3</sup>Институт биоорганической химии им. ак. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН,  
Москва, Россия

Из тромбоцитов курицы домашней (*Gallus gallus*) выделены индивидуальные фракции пептидов, которые обладают выраженным антимикробным действием и эффективно ингибируют антилизоцимную активность бактерий.

**Ключевые слова:** катионные антимикробные пептиды, тромбоциты, персистенция, антилизоцимная активность.

**Актуальность и цель работы.** Важной составляющей иммунной системы эукариот, которая обеспечивает защиту от патогенов, являются антимикробные пептиды (АМП), эффективные против широкого спектра бактерий, грибов и вирусов. В настоящее время данную группу соединений рассматривают в качестве замены или дополнения к традиционным антибактериальным препаратам, имеющим ряд существенных недостатков. Поиск эндогенных антибиотиков животного происхождения привёл к изучению нового объекта – АМП из тромбоцитов курицы домашней.

Ранее нами было показано, что кислотные экстракты из тромбоцитов кур обладают антимикробным действием, оказывают влияние на персистентные и вирулентные свойства микроорганизмов [1, 2]. Эти наблюдения определили дальнейшее направление нашей работы по выделению очищенных АМП из тромбоцитов кур и изучению их влияния на антилизоцимную активность (АЛА) бактерий, обеспечивающую длительное переживание (персистирование) патогена в макроорганизме и значительно затрудняющую терапию инфекций.

**Цель настоящего исследования** – изучение влияния очищенных АМП из тромбоцитов кур на антилизоцимную активность микроорганизмов.

**Материалы и методы.** При проведении работы использованы антимикробные пепти-

ды, полученные из уксуснокислого экстракта тромбоцитов курицы домашней (*Gallus gallus*) методом обращённо-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ-ВЭЖХ) в ступенчатом и линейном градиентах увеличения концентрации органического растворителя. Молекулярные массы пептидов измеряли на MALDI времяпролетном масс-спектрофотометре Ultraflex (Bruker Daltonics, Германия), оснащённым УФ-лазером с длиной волны 337 нм в линейном режиме. Масс-спектры анализировали с помощью программы Bruker DataAnalysis for TOF. Антимикробную активность полученных пептидов определяли методом микротитрования в бульоне. Влияние пептидных фракций на АЛА бактерий изучали *in vitro* в отношении тест-штаммов микроорганизмов: *Escherichia coli* K12, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* P209. Для определения антилизоцимной активности микроорганизмов после соинкубирования с субингибиторными концентрациями АМП использовали фотометрический метод [3]. Эффект регуляции АЛА бактерий считали существенным, если под воздействием соединений происходило её снижение на 20% и более, а от 0 до 20% – индифферентным. Статистическую обработку результатов проводили с использованием t-критерия Стьюдента.

**Результаты и обсуждение.** В результате фракционирования уксуснокислого экстракта тромбоцитов курицы домашней в гомогенном



виде было получено 13 фракций. При этом у 6 пептидных фракций с массами в диапазоне от 3,0 до 5,2 кДа, зафиксирована выраженная антимикробная активность в отношении *S. aureus*, *B. subtilis* и *E. coli*, их минимальные бактерицидные концентрации составляли от 20 до 175 мкг/мл. АМП 2-й и 7-й фракции демонстрировали антимикробную активность в отношении грамположительных микроорганизмов; 3-ей и 8-й – только в отношении *E. coli*. Фракции № 4, 5 и 6 антимикробной активностью не обладали.

При изучении влияния фракций, обладающих антимикробной активностью, на антилизосимную активность *E. coli*, *B. subtilis* и *S. aureus* установлено, что под действием тестируемых соединений происходило, преимущественно, снижение АЛА бактерий, вплоть до полной потери признака. Соинкубирование кишечной палочки с тестируемыми АМП в 50% случаев способствовало снижению АЛА в среднем на 58% по сравнению с контролем. Максимальное достоверное подавление признака выявлено при соинкубировании кишечной палочки с антимикробными пептидами 11-й фракции, при этом антилизосимная активность снижалась на 90% ( $p < 0,001$ ). 1-я пептидная фракция не оказывала влияния на данный признак. При изучении влияния тестируемых фракций на АЛА *S. aureus* в 70% случаев наблюдалось снижение данного признака в среднем на 60% от исходного уровня свойства. Максимальной способностью ингибировать антилизосимный признак *S. aureus* характеризовались первая и девятая фракции ( $p < 0,001$ ).

Фракции тромбоцитов кур оказывали индифферентное и ингибирующее влияние на АЛА *B. subtilis*. Установлено, что 60% тестируемых фракций снижали способность *B. subtilis* к инактивации лизоцима в среднем на 88%. После соинкубирования с пептидами 7-й фракции штаммы *B. subtilis* утрачивали способность ингибировать лизоцим.

Выявленное нами регулирующее влияние изученных АМП на АЛА бактерий можно объяснить с позиции механизмов антимикробного действия данной группы соединений, в частности возможного нарушения работы бактериального генома, поскольку известно, что некоторые АМП оказывают губительное действие на микробные клетки за счёт альтернативных механизмов, не связанных с повреждением мембран. Так, в работе E. F. Haney с соавт. (2013) показано, что производные антимикробных пептидов из эндосперма пшеницы могут связывать дезоксирибонуклеиновые кислоты (ДНК) и тем самым блокировать макромолекулярный синтез [4]. Выявлено, что буфорин II и тахиплезин, проникнув через мембрану бактериальной клетки, способны взаимодействовать с ДНК, вызывая гибель микроорганизмов [5].

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что тромбоциты курицы домашней являются источником 13 пептидных фракций, десять из которых обладают антимикробным действием и эффективно ингибируют антилизосимную активность бактерий. Проведённые исследования открывают перспективу для дальнейшего изучения АМП из тромбоцитов кур с целью их возможного использования в клинической практике в качестве антимикробного средства с антиперсистентным действием.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Сычёва М. В., Шейда Е. В., Жуков А. П. и др. Аграрный вестник Урала 2010, 7, 50-51.
2. Сычева М. В., Шейда Е. В., Карташова О. Л. и др. Вестник КрасГАУ 2011, 1, 130-132.
3. Бухарин О. В. Персистенция патогенных бактерий. М.: Медицина, 1999, 368 с.
4. Haney E. F., Petersen A. P., Lau C. K. et al. *Biochimica et Biophysica Acta* 2013, 1828 (8), 1802-1813.
5. Giuliani A., Pirri G., Rinaldi A. C. *Methods Mol Biol* 2010, 618, 137-154.

#### REGULATION OF THE ANTILYSOZYME ACTIVITY OF BACTERIA USING ANTIMICROBIAL PEPTIDES FROM CHICKEN'S PLATELETS

Sycheva M. V.<sup>1,2</sup>, Rogozhin E. A.<sup>3</sup>, Pashkova T. M.<sup>1</sup>, Peshkova Yu. I.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis UB RAS, Orenburg; <sup>2</sup>Orenburg State Agrarian University, Orenburg; <sup>3</sup>M. M. Shemyakin and Yu. A. Ovchinnikov Institute of bioorganic chemistry RAS, Moscow, Russia

From the platelets of homemade chicken (*Gallus gallus*), individual fractions of peptides that possess strong antimicrobial activity and effectively inhibit the antilysozyme activity of bacteria were isolated.

## ИЗМЕНЕНИЕ МИКРОБИОЦЕНОЗА КИШЕЧНИКА У ДЕТЕЙ С ЭКСТРЕМАЛЬНО НИЗКОЙ МАССОЙ ТЕЛА В ДИНАМИКЕ ПОСТНАТАЛЬНОГО ПЕРИОДА В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ГЕСТАЦИОННОГО ВОЗРАСТА

Устьянцева Л. С., Чистякова Г. Н., Ремизова И. И.,  
Ляпунов В. А., Газиева И. А.

*ФГБУ «Уральский научно-исследовательский институт охраны материнства и младенчества» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Екатеринбург, Россия*

С целью оценки изменения микрофлоры кишечника в динамике постнатального периода проведено бактериологическое обследование 36 образцов фекалий детей с экстремально низкой массой тела различного гестационного возраста. Установлено, что в раннем неонатальном периоде для микробиоценоза кишечника детей, рожденных в сроке сверхранних преждевременных родов, более характерна грамположительная микрофлора, тогда как для детей большего срока гестации – грамотрицательная. К концу позднего неонатального периода в фекалиях обеих исследуемых групп преобладала грамположительная кокковая колонизация, а к постконцептуальному возрасту 38-40 недель – грамотрицательная микрофлора.

*Ключевые слова:* экстремально низкая масса тела, микробиоценоз кишечника.

**Актуальность и цель работы.** Для адекватного формирования иммунного ответа новорожденных необходимо воздействие антигенов нормофлоры, которая активизирует не только местный иммунитет кишечника, но и иммунную систему всего организма [1,2]. Патологическое течение беременности и родов, морфофункциональная незрелость, внутриутробное или интранатальное инфицирование, наслоение или реализация инфекционного процесса, проведение медицинских манипуляций, позднее прикладывание к груди у детей с экстремально низкой массой тела (ЭНМТ) приводят к трансформации микробиоценоза с доминированием индигенной флоры [3]. Учитывая зависимость между бактериальной колонизацией кишечника и формированием иммунной системы, необходимо дальнейшее изучение становления микрофлоры кишечника новорожденных различного гестационного возраста в динамике постнатального периода.

**Цель исследования** – оценить состояние микрофлоры кишечника детей с ЭНМТ в раннем, позднем неонатальном периоде и по достижению постконцептуального возраста 38-40 недель.

**Материалы и методы.** Проведено бактериологическое исследование микрофлоры кишечника 36 образцов фекалий детей с ЭНМТ в возрасте 5-7 и 26-30 суток жизни, а также в постконцептуальном возрасте 38-40 недель. В 1-ю группу вошли 18 детей с гестационным возрастом 23-27 недель, во 2-ю группу – 18 детей с гестационным возрастом 28-31 неделя. Бактериологическое исследование фекалий проводили по методике количественного посева Ю. М. Фельдман и соавт. Идентификацию выделенных культур осуществляли с помощью коммерческих биохимических тест-систем фирмы «LACHEMA» (Чехия). Определение чувствительности к антибиотикам клинически значимых штаммов микроорганизмов проводили диск-диффузионным методом согласно МУК 4.2.1890-04.

**Результаты.** В результате бактериологического исследования фекалий детей с ЭНМТ выявлено, что к концу раннего неонатального периода в 44,4% случаев у недоношенных детей обеих групп на фоне антибактериальной терапии отсутствовала полостная кишечная микрофлора. Колонизация кишечника диагностировалась в 55,6% наблюдений. У детей 1-й

группы микробиоценоз кишечника был представлен преимущественно кокковой микрофлорой – коагулаза-отрицательными стафилококками и энтерококками – в 33,3% случаев. Энтеробактерии (*K. pneumoniae*,  $10^7$  КОЕ/мл) и неферментирующие грамотрицательные бактерии, представленные *S. maltophilia* в количестве  $10^5$  КОЕ/мл, колонизировали кишечник у 22,2% детей этой группы. Большая часть обнаруженной микрофлоры у детей 2-й группы (33,3%) относилась к классу энтеробактерий (*E. coli* и *K. pneumoniae* в количестве  $10^5$  КОЕ/мл и более) и грамотрицательных бактерий (*E. cloacae* и *P. aeruginosa* в количестве  $10^5$  КОЕ/мл и более), только 22,2% бактерий являлись кокковой флорой (*S. epidermidis*, *S. aureus*, *S. haemolyticus*,  $10^3$  КОЕ/мл и более). Стерильные фекалии к концу позднего неонатального периода выявлены у меньшего количества детей по сравнению с 5-7 сутками жизни – в 22,2% случаев у детей 1-й группы и у 11,1% новорожденных 2-й группы. В возрасте 26-30 суток жизни колонизация грамположительными кокками, грамотрицательными бактериями и энтеробактериями у детей 1-й группы установлена в меньшем проценте случаев, чем у детей 2-й группы (33,3% против 38,9% и 33,3% против 50% случаев). Среди представителей грамотрицательной и грамположительной микрофлоры у детей 1-й и 2-й групп преобладали *K. pneumoniae* в количестве  $10^5$  КОЕ/мл и более и *E. faecium* в количестве  $10^7$  КОЕ/мл и более – в 16,7% и 27,8% случаев. Смешанная микрофлора диагностировалась в обеих исследуемых группах в 5,6% случаев. К постконцептуальному возрасту 38-40 недель доля кокковой микрофлоры кишечника детей 1-й группы снизилась в 2 раза по сравнению с удельным весом этих микроорганизмов в конце позднего неонатального периода (16,7% против 33,3%), тогда как колонизация кишечника энтеробактериями и неферментирующими грамотрицательными бактериями достигала 83,3%. У детей 2-й группы среди представителей кишечного микробиоценоза преобладала грамотрицательная флора, но в меньшем проценте случаев – 55,6%. Лидирующее место сохраняла *K. pneumoniae* (в титре  $10^7$  КОЕ/мл и более), обнаружен-

ная в 55,6% и 27,8% случаев в обеих группах. Количество образцов фекалий, содержащих грамположительную флору, среди детей большего гестационного возраста в динамике от 26-30 суток жизни и до возраста доношенного ребенка увеличилось в 1,5 раза (с 22,2% до 33,3% случаев, в биологических образцах по-прежнему доминировал *E. faecium* в титре  $10^7$  КОЕ/мл и более). Доля кишечной микст-флоры составляла 16,7% и 5,6% в обеих группах. Стерильные фекалии обнаруживались только у детей 2-й группы в 11,1% случаев.

**Заключение.** Характер микробной колонизации кишечника на протяжении исследуемого периода имел особенности в зависимости от гестационного возраста. В раннем неонатальном периоде для микробиоценоза кишечника детей с гестационным возрастом 23-27 недель, более характерна грамположительная флора, тогда как для детей с гестационным возрастом 28-31 неделя – грамотрицательная. На фоне системной антибактериальной терапии наблюдалась общая тенденция заселения кишечника у обеих групп – преобладание грамположительной кокковой колонизации в течение позднего неонатального периода, обусловленное селекцией резистентных к применяемым антибактериальным препаратам кокков. К достижению возраста доношенного ребенка постнатальная колонизация кишечника детей с ЭНМТ характеризуется вытеснением кокковой микрофлоры грамотрицательной факультативно-анаэробной условно-патогенной микрофлорой, причем в большей степени у детей, родившихся с меньшим сроком гестации. Отмечается обеднение видового состава микрофлоры, что расценивается как крайне неблагоприятный фактор для формирования постнатального адаптивного иммунного ответа.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Урсова Н.И. Вопросы современной педиатрии 2011, 10 (4), 62-69.
2. Булатова Е.М., Богданова Н.М. Вопросы современной педиатрии 2007, 6 (3), 53-61.
3. Булатова Е.М., Богданова Н.М., Лобанова Е.А. и др. Педиатрия 2009, 3, 104-110.

## CHANGE OF INTESTINE MICROBIOCENOSIS IN CHILDREN WITH EXTREMELY LOW BIRTH WEIGHT IN THE COURSE OF POSTNATAL PERIOD DEPENDING ON THE GESTATIONAL AGE

Ustyantseva L. S., Chistyakova G. N., Remizova I. I., Lyapunov V. A., Gaziyeva I. A.

*FGBU "Ural Research Institute of Maternity and Infancy Welfare" Ministry Health of the Russian Federation, Yekaterinburg, Russia*

In order to estimate changes of intestine microbiocenosis in the course of postnatal period, we conducted a bacteriological examination of 36 samples of feces of children with ELBW of different gestational age. It was found that in early neonatal period intestine microbiocenosis of children born extremely prematurely was mostly characterized by gram-positive microflora, whereas it was gram-negative in children of longer gestation period. By the end of late neonatal period gram-positive cocci colonization prevailed in feces of both examined groups, and gram-negative microflora prevailed by postconceptional age of 38-40 weeks.

---

## ВЛИЯНИЕ НАНОМОДИФИЦИРОВАННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ НА ОРГАНИЗМ НЕМАТОД

Фахруллина Г. И., Ахатова Ф. С.

*Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия*

Применение моделей *in vivo* в системе холобионта в настоящее время рассматривается как перспективный способ исследования влияния наноматериалов на живые организмы. Нами разработан универсальный подход управляемой доставки наночастиц внутрь макроорганизма *Caenorhabditis elegans* с помощью нанопокрываемых бактерий *Escherichia coli*. В качестве тестируемых наноматериалов применяли галлазитные нанотрубки. Показано, что нематоды активно поглощают наномодифицированные микробные клетки. Нанотрубки проникали в организм нематод и равномерно распространялись по всему кишечнику. Было исследовано воздействие накопления наномодифицированных микроорганизмов на жизнеспособность (рост, репродуктивность и продолжительность жизни) микрочервей. Показано, что глинистые нанотрубки не индуцируют токсический эффект на почвенные нематоды.

**Ключевые слова:** микроорганизмы, почвенные нематоды, доставка наночастиц внутрь живого организма, оценка токсичности.

Утечка наноматериалов в процессе производства или эксплуатации продукции может представлять значительную опасность загрязнения окружающей среды. Особенно опасным может быть проникновение наночастиц в живые организмы. Воздействие наночастиц на организм может быть прямым и/или опосредованным кишечными симбионтами. Наночастицы могут негативно или положительно повлиять на жизнеспособность макроорганизма путем изменения состава и метаболизма микроорганизмов. Кроме того, биоаккумуляция и биотрансформация нано-

частиц (активация, инактивация, токсификация) бактериями может также оказать влияние на физиологию хозяина [1, 2]. Поэтому безопасность наночастиц на живой организм необходимо исследовать в симбиотической системе хозяин-микробиота (холобионт).

Такой системой может служить свободноживущая многоклеточная нематода *Caenorhabditis elegans*. Эти почвенные микрочерви питаются микроорганизмами, которые кроме питательной функции играют роль и кишечной микрофлоры [2]. Способность расти сотнями на одной чашки Петри, прозрачность

и размер тела (около 1 мм), короткий жизненный цикл (3 сут), короткая продолжительность жизни (2-3 нед), высокая плодовитость (300 потомков у одного червя), высокая гомология с геномом человека (60-80%), простота и дешевизна поддержания культуры в лаборатории делают этих червей идеальными модельными организмами в нанотоксикологии.

**Цель работы:** изучить токсичность нанотрубок галлуазита на нематод *C. elegans* с использованием микроорганизмов.

В качестве тестируемых наноматериалов использовали нанотрубки галлуазита происхождением из США (Applied Minerals, NY). В качестве носителей наночастиц использовали обычный пищевой субстрат почвенных нематод – бактерии *Escherichia coli* OP50.

Для достижения поставленной цели были поставлены следующие задачи: закрепить нанотрубки галлуазита на поверхность микроорганизмов методом послойного нанесения полиэлектролитов; доставка галлуазит-содержащих бактерий в организм макроорганизма методом культивирования; оценить влияние наномодифицированных бактерий на жизнеспособность нематод; изучить распределение нанотрубок галлуазита в организме нематод методами микроскопии высокого разрешения.

Клеточная стенка бактерий *E. coli* имеет суммарный отрицательный поверхностный заряд. Поэтому нанотрубки галлуазита (0,05; 0,1; 1; 5 мг/мл) стабилизировали положительно-заряженным полиэлектролитом (полиаллиламин гидрохлорид, 70 кДа, 5 мг/мл) и закрепляли на поверхность отрицательно-заряженной клеточной стенки бактерий [3]. Такие наномодифицированные микроорганизмы добавляли в качестве пищи ( $10^{10}$  клеток/мл) синхронизированным по возрасту нематодам личиночной стадии L1. Бактериальные клетки, несущие на себе наночастицы, за счет активных глотательных движений оказываются внутри пищеварительного тракта нематод. Спустя 3 сут. оценивали влияние нанотрубок галлуазита на рост и репродуктивный потенциал. Для этого популяцию нематод смывали с чашек Петри и подвергали температурной фиксации в течение 10-30 с. Путем сравнения экспериментальных и контрольных червей оценивали изменения, произошедшие под влиянием наномодифицированных бактерий.

Анализ изменений длины тела микрочервей является одним из неотъемлемых параметров

токсических эффектов. Нанотрубки галлуазита в пределах концентраций 0,05-1,00 мг/мл ингибирует нормальный рост тела нематод по сравнению с необработанными образцами [3]. Однако, глинистые нанотрубки не уменьшают размер тела так, как сообщалось для аминомодифицированных однослойных углеродных нанотрубок [4], где было обнаружено почти двукратное сокращение длины тела у *C. elegans*. Анализ влияния нанотрубок галлуазита на воспроизводство червей проводили путем подсчета количества яиц у беременных особей нематод *C. elegans*. Выявлено, что галлуазитные нанотрубки не оказывают существенного влияния на репродуктивность микрочервей [3].

Далее мы исследовали влияние нанотрубок галлуазита на продолжительность жизни нематод *C. elegans*. Анализ проводили в 96-луночных планшетах по методике [5]. Кумулятивный анализ выживаемости показал, что во всех изученных концентрациях, нанотрубки галлуазита никакого существенного негативного влияния на продолжительность жизни нематод не оказывают [3]. Более низкие концентрации (0,05, 0,1 мг/мл) не снижают долговечность червей, тогда как более высокие концентрации (0,5, 1 мг/мл) несколько снизили среднюю продолжительность жизни (до ~15% по сравнению с контролем), хотя это снижение не было статистически значимым ( $P > 0,05$ ).

Визуализацию нанотрубок внутри организма нематод наблюдали в темнопольном гиперспектральном микроскопе Cyto Vivo. Галлуазитные нанотрубки в виде ярких пятен были обнаружены исключительно в пищеварительном тракте червей, начиная с ротовой полости до ануса, с видными скоплениями в области глотки. В среднем и заднем отделах кишки нанотрубки были также четко видны, однако наблюдалось меньше агрегаций. Для единичных изолированных нанотрубок галлуазита было характерно броуновское движение в кишечнике нематод. Важно отметить, что вне кишечника нематод нанотрубки галлуазита не обнаружены [3].

Наше исследование показало, что использование микробных клеток эффективно для контролируемой доставки нанотрубок галлуазита в макроорганизм *C. elegans*. Галлуазитные нанотрубки в исследованных концентрациях не способны серьезно повредить организм не-

матод, нанося только механическую нагрузку на пищеварительную систему. В целом, низкая токсичность нанотрубок галлуазита на почвенные нематоды предполагает, что его быстро растущее промышленное применение, вероятно, будет экологически безопасным.

Исследование выполнено за счет гранта FSAX-14-60155-0 Американского фонда гражданских исследований и развития (CRDF Global).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Spann N., Goedkoop W., Traunspurger W. *Environ Sci Technol* 2015, 49, 1842-1850.
2. Cabreiro F., Gems D. *EMBO Mol Med* 2013, 5, 1300-1310.
3. Fakhrullina G. I., Akhatova F. S., Lvov Y. M., Fakhrullin R. F. *Environ Sci Nano* 2015, 2, 54-59.
4. Chen P.-H., Hsiao K.-M., Chou C.-C. *Biomaterials* 2013, 34, 5661-5669.
5. Solis G. M. *J Vis Exp* 2011, 49, e2496.

## THE IMPACT OF NANOMODIFIED MICROORGANISMS ON NEMATODES

Fakhrullina G. I., Akhatova F. S.

*Kazan Federal University, Kazan, Russia*

Using *in vivo* holobiont models is as a promising way to investigate the impact of nanomaterials on the living organisms. We have developed a universal approach for controlled delivery of nanoparticles into the macroorganism *Caenorhabditis elegans* using the nanocoated bacteria *Escherichia coli*. We have employed microworms to investigate the toxicity of halloysite nanotubes. We have shown that the nematodes actively ingest the nanomodified microbial cells. The nanotubes have entered into the body of nematodes and were evenly distributed along the whole intestine. The accumulation of nanoparticles was visualized by high-resolution microscopy. We investigated the impact of the accumulation the nanomodified microorganisms on viability microworms (growth, reproduction and lifespan). We have shown that the clay nanotubes do not induce toxic effect on soil nematodes.

## МИКРОБНЫЙ ПЕЙЗАЖ У ПАЦИЕНТОВ С ГНОЙНО-НЕКРОТИЧЕСКИМИ ФОРМАМИ СИНДРОМА ДИАБЕТИЧЕСКОЙ СТОПЫ: АНАЛИЗ СЛУЧАЕВ ЗА 2012-2014 ГГ

Шлепотина Н. М., Колесников О. Л., Плоткин Л. Л.

*ГБОУ ВПО «Южно-Уральский государственный медицинский университет»  
Минздрава России, Челябинск, Россия*

Синдром диабетической стопы – тяжелое осложнение сахарного диабета, представляющее собой деструкцию или инфекцию глубоких тканей стопы на фоне патологии сосудов и/или нервов. За период с 2012 по 2014 год произведено ретроспективное когортное исследование среди пациентов с гнойно-некротическими формами синдрома диабетической стопы с анализом данных бактериологического исследования раневого отделяемого. В 55,0% случаев наблюдались моноинфекции, а в 45,0% случаев – наличие бактериальных ассоциаций. При этом наблюдалась тенденция к преобладанию *Staphylococcus aureus*, а также бактерий семейства *Enterobacteriaceae*.

*Ключевые слова:* синдром диабетической стопы, микробный пейзаж, бактериальные ассоциации.

Актуальность. По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), во всех странах мира насчитывается более 120 млн. больных сахарным диабетом (СД) [1]. Синдром

диабетической стопы (СДС) – это «инфекция, язва и/или деструкция глубоких тканей, связанная с нарушением нервной системы и снижением магистрального кровотока в артериях нижних конечностей различной степени тяжести» [2]. СДС диагностируется у 4-10% пациентов с СД [3].

**Цель исследования.** Выявить спектр основных возбудителей, выделяемых при гнойно-некротических формах СДС.

**Материалы и методы.** Произведено ретроспективное когортное исследование с анализом данных медицинских карт стационарных больных (форма 003/у) за период с января 2012 года по декабрь 2014 года на базе отделения гнойной хирургии НУЗ «Дорожная клиническая больница на ст. Челябинск ОАО «РЖД». Источниковая нозологическая популяция включила в себя 169 пациентов в возрасте старше 18 лет с гнойно-некротическими формами СДС.

**Результаты.** В исследуемой популяции средний возраст пациентов составил 62,8 лет (38; 84). Удельный вес лиц мужского пола – 56,8% (n=96), удельный вес лиц женского пола – 43,2% (n=73). Пациенты, страдающие СД I типа, составили 11,8% (n=20), наличие СД II типа было отмечено в 88,2% случаев (n=149). Нейроишемическая форма СДС была выявлена у 166 пациентов (98,2%), смешанная форма – у 3 пациентов (1,8%). Нозологическая структура СДС включила в себя трофические язвы стопы (31,4%; n=53) и/или голени (1,8%; n=3) с признаками инфицирования, раны стопы (6,5%; n=11) и/или голени (1,8%; n=3) с признаками инфицирования, диабетическую остеоартропатию (1,8%; n=3), остеомиелит костей стопы (4,1%; n=7), флегмону стопы (23,7%; n=40), флегмону голени (1,8%; n=3), гангрену пальцев (16,0%; n=27), гангрену стопы (17,8%; n=30), гангрену голени (1,8%; n=3).

При изучении данных результатов бактериологического исследования раневого отделяемого у 93 пациентов (55,0%) были выявлены моноинфекции, вызванные одним бактериальным агентом, а у 76 человек (45,0%) – бактериальные ассоциации. В этиологической структуре моноинфекций были выделены такие возбудители, как *Staphylococcus aureus* (49,5%; n=46), *Enterococcus* spp. (15,1%; n=14), *Staphylococcus epidermidis* (7,5%; n=7), *Pseudomonas aeruginosa* (7,5%; n=7). Также в исследуемой популяции из раневого отделяемого

были выделены следующие бактерии вне ассоциаций: *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Stenotrophomonas maltophilia*, бактерии родов *Acinetobacter*, *Enterobacter*, *Corynebacterium*, *Streptococcus*, *Proteus*, что в совокупности составило 20,4% (n=19).

Среди бактериальных ассоциаций из очагов гнойно-некротического воспаления были выделены двухкомпонентные (64,5%; n=49), трехкомпонентные ассоциации (26,3%; n=20), а также ассоциации из большего числа видов бактерий (до 6) (9,2%; n=7). В составе ассоциаций сложилась тенденция к преобладанию таких бактериальных агентов, как *S. aureus* (44,7%; n=34), *S. epidermidis* (21,1%; n=16), *P. aeruginosa* (15,8%; n=12), *Escherichia coli* (6,6%; n=5), бактерии родов *Enterococcus* (43,4%; n=33), *Enterobacter* (21,1%; n=16), *Acinetobacter* (13,2%; n=10), *Corynebacterium* (13,2%; n=10). Также в составе бактериальных ассоциаций были выделены представители родов *Klebsiella*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Proteus*, *Morganella*, *Burkholderia*, что в совокупности составило 30,3% (n=23). Среди бактериальных ассоциаций сложилась тенденция к преобладанию сочетания *S. aureus* + *Enterococcus faecalis* (13,2%; n=10).

#### Выводы.

1. При гнойно-некротических формах СДС в 55,0% случаев наблюдались моноинфекции, а в 45,0% случаев – наличие бактериальных ассоциаций.

2. У пациентов исследуемой когорты при бактериологическом исследовании раневого отделяемого как при моноинфекциях, так и при наличии бактериальных ассоциаций наблюдалась тенденция к преобладанию *S. aureus*, а также бактерий семейства *Enterobacteriaceae*.

3. Среди всех ассоциаций, выделенных у пациентов с СДС, 64,5% составили двухкомпонентные.

4. В микробном пейзаже бактериальных ассоциаций сложилась тенденция к преобладанию сочетания *S. aureus* + *E. faecalis* (13,2%).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Светухин А.М. Consilium Medicum 2002, 4, 537-544.
2. Международное соглашение по диабетической стопе. Берез, Москва 2000, 96 с.
3. Комелягина Е. Ю. Российский медицинский журнал 2003, 27, 1514-1517.

## MICROBIAL LANDSCAPE IN PATIENTS WITH PURULENT-NECROTIC FORMS OF DIABETIC FOOT SYNDROME: ANALYSIS OF CASES DURING THE PERIOD FROM 2012 TO 2014

Shlepotina N. M., Kolesnikov O. L., Plotkin L. L.

*South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russia*

Diabetic foot syndrome is a serious complication of diabetes that is manifested in destruction or deep tissue infection of the foot against the background of vascular and/or nervous pathology. The retrospective cohort study was carried out among the patients with purulent-necrotic forms of diabetic foot syndrome with the analysis of data of bacteriological study of wounds. It was established that 55,0% of cases included the mono-infections, and 45,0% of cases included the bacterial associations. At the same time there was a tendency to a predominance of *Staphylococcus aureus* and bacteria of the family *Enterobacteriaceae*.

---

---

## ВОЗРАСТНЫЕ ОСОБЕННОСТИ КИШЕЧНОГО БИОЦЕНОЗА У ДЕТЕЙ В УСЛОВИЯХ СЕВЕРА

Шейкин И. Ю., Данилов Н. А., Ахременко Я. А.,  
Тарасова Л. А.

*ФГАОУ ВПО «Северо-Восточный федеральный университет им. М. К. Аммосова»,  
Медицинский институт, Якутск, Россия*

Проанализирован состав кишечной микрофлоры у 399 практически здоровых детей от 1 до 18 лет, проживающих в г. Якутске. Выявлено различие содержания индигенных микроорганизмов в различные возрастные периоды. Показатели лактобактерий являются наиболее низкими и нестабильными на протяжении всего детского возраста, что, возможно, является региональной особенностью кишечного биоценоза у детей в условиях Севера.

*Ключевые слова:* кишечный биоценоз, микробная экология, дисбиоз толстого кишечника, индигенные микроорганизмы.

**Актуальность и цель работы.** В современных условиях резко возросло число стрессовых воздействий и неблагоприятных экологических факторов, сопровождающихся глубокими нарушениями микробной экологии организма человека. Особую актуальность это имеет для северных регионов.

Республика Саха (Якутия) и г. Якутск имеют ряд специфических климатогеографических особенностей. Климат в регионе резко-континентальный, он характеризуется длинной, холодной зимой и коротким жарким летом. Зимой много снега, а летом бывает мало влаги. Загрязненность воздуха в Якутске выше, чем в других северных городах России. Вода реки Лены и почва в районе Якутска считаются среднезагрязненными, но из-за холодного климата медленно очищаются. Все

северные экосистемы обладают пониженной способностью к самоочищению и микробиологической утилизации вредных веществ из-за вечной мерзлоты и низких температур в почве и водоемах.

Здоровье детей – наиболее чувствительный показатель, отражающий состояние окружающей среды. Многочисленные данные свидетельствуют о том, что в экологически неблагоприятных регионах регистрируется повышенная заболеваемость детского населения. Так, нашими исследованиями показано, что преморбидные состояния (дисфункции желудочно-кишечного тракта, эпизоды пищевой аллергии, частые респираторные инфекции) выявляются более чем у трети (33,9%) детей дошкольного возраста, проживающих в г. Якутске и относящихся к группе «практически здоровых» [1].



Если рассматривать заболеваемость детского населения в условиях Севера за последние 10 лет, то первое место из года в год занимают болезни органов дыхания, на втором месте неизменно остаются заболевания органов пищеварения. Наряду с этим, отмечается неуклонный рост патологии кожи и подкожной клетчатки, среди которых ведущее место занимает атопический дерматит. В патогенезе всех этих патологических состояний основным механизмом является снижение колонизационной резистентности и развитие дисбиозов.

**Цель исследования:** изучение состояния микрофлоры толстого кишечника у детей различных возрастных групп в условиях Севера на примере г. Якутска.

**Материалы и методы.** Нами обследовано более 1000 детей от 1 до 18 лет, проживающих в г. Якутске, выборка составила 399 практически здоровых детей. Все они разделены на возрастные группы по классификации ВОЗ. В данных группах определяли количественный и качественный состав микрофлоры толстого кишечника. Так, в группу детей 1-3 и 12-18 лет вошли по 100 детей, 4-7 лет – 119 детей и 8-11 лет – 80 детей, постоянно проживающих в г. Якутске и не имеющих острых и хронических заболеваний на момент обследования. Особое внимание обращали на содержание индигенной микрофлоры: бифидо- и лактобактерий, полноценных эшерихий и энтерококков.

Количественное содержание индигенных бактерий определяли по формуле  $Covali-Sforza$  и выражали в lg колониеобразующих единиц на 1 грамм исследуемого материала (lg КОЕ/г). Оценку состояния микрофлоры толстого кишечника проводили по «Унифицированной рабочей классификации нарушений микробиоценоза кишечника», предложенной И. Б. Куваевой и К. С. Ладодо, дополненной А. А. Воробьевым.

**Результаты.** У детей 1-3 лет содержание бифидобактерий снижено, но у большинства находится в пределах нормы (10 lg КОЕ/г) и выявляются у всех детей данной возрастной группы, однако снижено число полноценных эшерихий (до 4,3 lg КОЕ/г) и лактобактерий (до 4,6 lg КОЕ/г) при высеваемости 57 и 92% соответственно.

В возрасте 4-7 лет микробный пейзаж кишечника практически такой же, но начинается уменьшение числа бифидобактерий (в среднем до 9 lg КОЕ/г) при 100%-ной высеваемости,

на этом фоне увеличивается частота обнаружения стафилококков и условно-патогенных энтеробактерий. Именно в этом возрасте увеличивается количество т.н. часто и длительно болеющих детей, которых по данным педиатров, на севере около 80% [2].

В возрасте от 8 до 11 лет почти у 100% детей отмечается дефицит лакто- и бифидобактерий. В данной возрастной группе зафиксированы наименьшие показатели содержания индигенных грампозитивных микроорганизмов – лакто- и бифидобактерий, энтерококков (4,4; 8,7 и 5 lg КОЕ/г соответственно). Однако к подростковому возрасту количество всех индигенных микроорганизмов начинает нарастать и стабилизируется на уровне 8,8 lg КОЕ/г для бифидобактерий и 6,4 lg КОЕ/г для лактобактерий.

Таким образом, можно резюмировать, что у детей в условиях Севера изменения в микробиоценозе толстого кишечника характеризуются снижением лактобактерий (у 85,5% детей) и бифидобактерий (у 74,2%). На этом фоне активизируется условно-патогенная микрофлора. У 15,2% детей в высоких титрах определялись условно-патогенные энтеробактерии (клебсиеллы, цитробактер, энтеробактер и др.). Почти в 30% случаев обнаруживались и патогенные микроорганизмы – гемолизирующие эшерихии и *S. aureus*.

#### **Выводы:**

1. Наблюдается устойчивая тенденция к нарушению кишечного биоценоза даже у здоровых детей, проживающих в северных экосистемах.

2. Нарушения кишечного биоценоза характеризуются снижением содержания в кишечнике защитной микрофлоры (лакто- и бифидобактерий), активизацией на этом фоне нежелательных микроорганизмов (условно-патогенных энтеробактерий, атипичных эшерихий и стафилококков).

3. При переходе из одного возрастного периода в другой наблюдается снижение количества бифидобактерий с последующей стабилизацией в подростковом периоде, количество же полноценных эшерихий стабильно нарастает к периоду взросления, а содержание энтерококков находится в пределах нормы во все возрастные периоды.

4. Показатели лактобактерий являются наиболее низкими и нестабильными на протяжении всего детского возраста, возможно, это является региональной особенностью ки-

шечного биоценоза в условиях Севера и влияет на предрасположенность к различным заболеваниям респираторного и желудочно-кишечного тракта, ослабляя иммунную защиту и колонизационную резистентность детского организма.

В заключение необходимо отметить, что контроль за изменениями микрофлоры и резистентности наружных покровов и слизистых оболочек позволяет выявить состояние предболезни, когда процессы еще обратимы и могут быть устранены мягкими средствами (пробиотики, иммуномодуляторы). Кроме этого, необходимо пересмотреть классификацию кишечных дисбиозов применительно

к условиям Севера и проводить изыскание новых подходов к профилактике и коррекции кишечных дисбиозов с учетом региональных особенностей кишечной микрофлоры и структуры заболеваемости населения, направленных на поддержание колонизационной резистентности в целом.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Красноженов Е. П., Ахременко Я. А. Колонизационная резистентность организма человека в норме и при патологии. МЦНИП, Киров 2013.
2. Ахременко Я. А., Уарова А. В., Саввина Н. В., Красноженов Е. П. Журнал инфекционной патологии 2010, 17 (3), 21-23.

### AGE FEATURES OF CHILDREN INTESTINAL BIOCECENOSIS IN THE NORTH

Sheikin I. U., Danilov N. A., Akhremenko Y. A., Tarasova L. A.

*Norht-Eastern Federal University, Yakutsk, Russia*

Composition of the gut microflora of 399 healthy children aged 1 to 18 years, living in Yakutsk, was analyzed. Distinctions in the content of indigenous microorganisms at different ages were estimated. Indicators of lactobacilli are the lowest and unstable throughout the childhood that may be a regional feature of intestinal biocenosis of children in the North.

### АНТИЛИСТЕРИОЗНАЯ АКТИВНОСТЬ *ENTEROCOCCUS FAECIUM* EF790SAU *IN VIVO*

Щепитова Н. Е.<sup>1</sup>, Пашкова Т. М.<sup>2</sup>, Собянин К. А.<sup>3</sup>,  
Сычева М. В.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>ФГБОУ ВПО «Оренбургский государственный аграрный университет», Оренбург;

<sup>2</sup>ФГБУН «Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза» УрО РАН, Оренбург;

<sup>3</sup>ФГБУ НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва, Россия

Установлена способность штамма *Enterococcus faecium* Ef790SAU снижать летальность и микробную обсеменённость внутренних органов при экспериментальной листериозной инфекции у морских свинок.

**Ключевые слова:** экспериментальная инфекция, *Enterococcus faecium*, *Listeria monocytogenes*, антагонистическая активность.

**Актуальность и цель работы.** Листериоз – тяжело протекающее инфекционное заболевание животных и людей, относящееся к классу сапронозов. В последнее время проблема листериоза приобрела социально-экономическую значимость, так как помимо

профессиональных рисков работников сельского хозяйства, отмечены крупные вспышки, связанные с употреблением в пищу сыров, салатов, молочных и мясных продуктов, контаминированных листериями [1]. В настоящее время для предотвращения размножения этих

патогенных микроорганизмов в продуктах питания успешно применяются бактериоцины, синтезируемые молочнокислыми микроорганизмами [2]. Известно, что бактериоцины энтерококков (энтероцины) обладают эффективной антилистериозной активностью [3].

Ранее нами были изучены биологические свойства фекальных культур энтерококков, выделенных от животных [4, 5], и отобран штамм *Enterococcus faecium* Ef79OSAU, изолированный из кишечника свиньи, который обладал выраженным антагонистическим эффектом в отношении бактерий рода *Listeria in vitro* и не имел факторов патогенности на фено- и генотипическом уровне. Штамм депонирован в Государственной коллекции микроорганизмов нормальной микрофлоры (ГКНМ) ФГУН «Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора. Вышеизложенное определило дальнейшее направление нашей работы: изучение антагонистической активности культуры *Enterococcus faecium* Ef79OSAU *in vivo* на модели экспериментальной листериозной инфекции.

**Материалы и методы.** Для воспроизведения экспериментальной листериозной инфекции использовали беспородных морских свинок обоих полов массой 200–250 г. Все эксперименты с животными выполнены в соответствии с этическими принципами и нормативными документами, рекомендованными Европейским научным фондом (ESF), и декларацией о гуманном отношении к животным.

Животные были разделены на две равные группы: опытную (n=9) и контрольную (n=9). Животным опытной группы в течение 7 сут. до заражения задавали один раз в сутки *per os* по 1 мл взвеси суточной культуры *Enterococcus faecium* Ef79OSAU в изотоническом растворе NaCl, содержащей  $1 \cdot 10^9$  микробных клеток.

Для заражения животных обеих групп использовали экспоненциальную культуру *Listeria monocytogenes* VIMHA 004, отмытую фосфатным буфером и замороженную при  $-70^\circ\text{C}$  в 10%-ном глицерине. Концентрацию колониеобразующих единиц (КОЕ) в замороженной культуре определяли предварительно по высевам последовательных разведений. Заражение осуществляли введением *per os* штамма в дозе  $1 \cdot 10^{10}$  бактерий на морскую свинку.

Животных выводили из эксперимента передозировкой эфирного наркоза через 24 ч, 3 и 5 сут. инфекции. Для оценки обсеменен-

ности органов *L. monocytogenes* в асептических условиях морских свинок вскрывали и стерильно отбирали внутренние органы: печень с желчным пузырем, целиком селезенку, участок тонкого кишечника длиной 20 мм.

Для бактериологического исследования образцы органов взвешивали, гомогенизировали в фарфоровых ступках со стерильным песком в PBS-буфере (Хеликон, Россия) в соотношении 1:2. Суспензию органов вносили в количестве 1 мл на чашки с агаром для идентификации листерий (PALCAM) (HiMedia, Индия), растирали шпателем Дригальского и инкубировали при  $30^\circ\text{C}$  в течение 48 ч. При обнаружении характерного для листерий роста (серо-зеленые колонии с темным центром и темным ореолом) проводили микроскопию, подсчитывали число выросших колоний, рассчитывали содержание листерий в 1 г органа. Полученные в ходе исследований численные материалы были обработаны статистически.

**Результаты.** В ходе проведенных исследований установлено, что заражение морских свинок вызывает развитие инфекции, сопровождающейся гибелью 33,3% животных контрольной группы. Через сутки после инфицирования погибли две морские свинки, через 5 сут. пало ещё одно животное контрольной группы. В опытной группе гибель животных от листериозной инфекции не наблюдали.

Этим данным соответствовали и результаты определения показателя микробной обсемененности (КОЕ/г) внутренних органов у животных исследуемых групп. Количество листерий в органах морских свинок, получавших культуру энтерококков, на 3-и и 5-е сут. инфекции было достоверно меньше, чем в органах животных контрольной группы.

В обсемененности листериями селезенки морских свинок опытной и контрольной групп наблюдалась тенденция к первоначальному увеличению числа бактерий в органе к 3-м сут. инфекции с последующим уменьшением количества листерий к последнему дню эксперимента. Через 3-ое сут. после инфицирования, концентрация листерий в селезенке животных опытной группы достигала  $244 \pm 20,7$  КОЕ/г, что в среднем в 1,3 раза меньше таковой в контрольной группе ( $p < 0,05$ ). В опытной группе морских свинок количество листерий в селезенке на 5-е сут. течения инфекции было достоверно ниже ( $26 \pm 7,4$  КОЕ/г), чем в контрольной группе ( $184 \pm 16,0$  КОЕ/г) ( $p < 0,001$ ).

Аналогичную тенденцию наблюдали при изучении результатов посевов ткани печени: обсемененность *L. monocytogenes* VIMHA 004 печени животных опытной группы к 3-м сут. инфекции составила  $236 \pm 17,4$  КОЕ/г против  $279 \pm 12,1$  КОЕ/г в контрольной группе. На 5-е сут. от момента заражения в опытной группе животных отмечалось достоверное снижение количества листерий в печени по сравнению с контролем ( $9 \pm 1,8$  КОЕ/г против  $1305 \pm 21,6$  КОЕ/г, соответственно) ( $p < 0,001$ ).

Концентрация листерий в кишечнике животных обеих групп возрастала с течением времени. При этом степень обсемененности листериями кишечника морских свинок на 3 и 5 сут. инфекции была ниже в опытной группе животных ( $p < 0,05$ ). На 3-и сут. инфекционного процесса в кишечнике животных, получавших культуру энтерококков, число листерий составило  $377 \pm 7,2$  КОЕ/г, в контрольной группе –  $407 \pm 8,7$  КОЕ/г; на 5-е сут. аналогичные показате-

ли для опытной и контрольной групп составили  $1600 \pm 54,8$  и  $1796 \pm 39,7$  КОЕ/г, соответственно.

Таким образом, выявленный в данном исследовании защитный эффект штамма *E. faecium* Ef79OSAU при экспериментальной листериозной инфекции служит обоснованием для дальнейшего изучения свойств культуры, которую можно использовать в качестве компонента биопрепаратов пробиотической направленности.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Пушкарева В. И., Ермолаева С. А. Эпидемиология и вакцинопрофилактика 2012, 2, 10-20.
2. Khan H., Flint S., Yu P. L. Int J Food Microbiol 2010, 141 (1-2), 1-10.
3. Ермоленко Е. И. Вестник СлбГУ 2009, 11 (3), 184-201.
4. Щепитова Н. Е., Сычева М. В., Карташова О. Л. Вестник ветеринарии 2014, 69, 50-53.
5. Щепитова Н. Е., Сычева М. В., Карташова О. Л. Вестник ОГУ 2014, 13, 129-134.

### ANTILISTERIAL ACTIVITY OF *ENTEROCOCCUS FAECIUM* EF79OSAU IN VIVO

Shchepitova N. E.<sup>1</sup>, Pashkova T. M.<sup>2</sup>, Sobyenin K. A.<sup>3</sup>, Sycheva M. V.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Orenburg State Agrarian University, Orenburg; <sup>2</sup>Institute of cellular and intracellular symbiosis UrD RAS, Orenburg; <sup>3</sup>Federal scientific research centre of epidemiology and microbiology named by N. F. Gamaleya, Moscow, Russia

The ability of the strain *Enterococcus faecium* Ef79OSAU to reduce mortality and microbial contamination of internal organs in experimental *Listeria* infection in Guinea pigs was determined.

### НЕКОТОРЫЕ ВАРИАНТЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ГНОЙНО-ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ С ЭРИТРОЦИТАМИ ЧЕЛОВЕКА

Щуплова Е. А.

Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН,  
Оренбург, Россия

Изучены факторы патогенности штаммов, выделенных от больных с гнойно-воспалительными заболеваниями, а также исследована распространенность и выраженность антигемоглобиновой активности (АнтиНбА). Данный признак позволяет оценить уровень остаточного гемоглобина в субстрате после контакта с микроорганизмами и способствует изучению новых факторов патогенности бактерий при взаимодействии с эритроцитами. С помощью сканирующей конфокальной лазерной микроскопии было установлено, что у штаммов *S. epidermidis* и *E. coli* с высокими значениями АнтиНбА и низким уровнем ГА чаще наблюдали адгезию к эритроцитам и внутриэритроцитарную инвазию, чем у штаммов с низким уровнем АнтиНбА и высоким уровнем ГА.

Ключевые слова: бактерии, эритроциты, факторы патогенности.

**Актуальность и цель работы.** В настоящее время изучение новых факторов патогенности микроорганизмов при взаимодействии с эукариотами остается актуальным как в биологии, так и в медицине. Известно несколько вариантов взаимодействия бактерий с эритроцитами: адгезия, гемолиз и утилизация железа из гемоглобина [1]. Данные литературы показывают, что многие патогенные микроорганизмы способны не только к адгезии на эритроцитах, но и проникают внутрь них и утилизируют из гемоглобина ионы железа [1, 2]. Однако ограничены сведения о взаимодействии условно-патогенных видов бактерий с эритроцитами.

**Цель работы** – изучить распространенность и выраженность антигемоглобиновой активностисредивозбудителейгноино-воспалительных заболеваний (ГВЗ) и оценить взаимодействие *Staphylococcus epidermidis* и *Escherichia coli* с эритроцитами человека.

**Материалы и методы.** Материалом для исследования данной работы послужили 60 штаммов рода *Staphylococcus*: *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. cohnii*, *S. saprophyticus*, а также 5 штаммов *Bacillus cereus*, 8 штаммов *Escherichia coli*, выделенных от больных с разными формами ГВЗ, такие как фурункулы, флегмоны, абсцессы, перитониты и сепсис. Выделение и идентификацию чистых культур бактерий проводили на основании общепринятых методов [3]. Для идентификации использовали стандартные системы StaphyTest, EnteroTest (LaChema, Чехия). У выделенных штаммов микроорганизмов изучали факторы патогенности: плазмокоагулазную (КоА) и лецитовителлазную (ЛеЦА) активности по известным методам [3], а гемолитическую (ГА) и антигемоглобиновую (АнтиНбА) активности оценивали с помощью разработанных фотометрических методов [1].

При изучении особенностей взаимодействия бактерий с эритроцитами *in vitro* использовали условно-патогенные штаммы *S. epidermidis* и *E. coli*, выделенные от больных ГВЗ и отличающиеся по уровню ГА и АнтиНбА. Штамм *S. epidermidis* № 3 обладал низким уровнем ГА (15,4±3,5% гемолиза) и высокими значениями АнтиНбА (6,7±2,2 г/л). Штамм *S. epidermidis* № 10 обладал высоким уровнем ГА (72,4±6,8% гемолиза) и низким уровнем АнтиНбА (0,9±1,1 г/л). Штамм *E. coli* № 15 характеризовался низкими значениями ГА (17,8±3,6% гемолиза) и высокими АнтиНбА

(8,1±3,1 г/л). Штамм *E. coli* № 17 обладал высоким уровнем ГА (80,3±7,0% гемолиза) и низким АнтиНбА (0,2±0,8 г/л). Далее исследуемые штаммы *S. epidermidis* № 3, 10 и *E. coli* № 15, 17 выращивали на мясо-пептонном агаре при 37°C в течение 24 ч. Из выросшей агаровой культуры готовили взвесь микроорганизмов в физиологическом растворе (10 ед. по оптическому стандарту мутности ГИСК имени Л. А. Тарасевича). Затем отмытые буферным раствором эритроциты в концентрации 10<sup>6</sup> клеток/мл объемом 0,5 мл смешивали с взвесью бактерий *S. epidermidis* или *E. coli* объемом 1 мл, после чего добавляли 1мл среды 199 (НИИ вакцин и сывороток имени И. И. Мечникова, Уфа). В качестве контроля брали взвесь эритроцитов объемом 0,5 мл, которую вносили в 1 мл физ. раствора и добавляли 1 мл среды 199. Опытные и контрольные пробы инкубировали 3 ч при 37°C. Исследуемые пробы обрабатывали для сканирующей конфокальной лазерной микроскопии (СКЛМ) по описанной выше методике [4]. Полученные результаты были подвергнуты статистической обработке [5].

**Результаты.** При исследовании факторов патогенности и персистенции оказалось, что выделенные штаммы от больных с ГВЗ в 41,0±4,7% случаев характеризовались КоА, а в 47,5±4,9% – ЛеЦА. При исследовании гемолитической активности оказалось, что высоким уровнем ГА обладали 69,5±5,7% выделенных штаммов. Аналогичные данные получили при определении антигемоглобиновой активности микроорганизмов. Выделенные штаммы от больных ГВЗ в 83,8±5,3% случаев обладали высоким уровнем АнтиНбА.

На следующем этапе данной работы изучили спектр распространенности и выраженности АнтиНбА у выделенных штаммов. Первостепенное место по распространенности данного признака занимали грамотрицательные палочки – *E. coli*, что составляло 85,6±8,9%. Аналогичные значения получили и у грамположительных палочек – *B. cereus*: наблюдали высокие значения как по частоте встречаемости (77,6±8,2%), так и по среднему уровню выраженности АнтиНбА (7,3±2,7 г/л). Среди рода *Staphylococcus* по распространенности исследуемого признака наиболее часто АнтиНбА наблюдалась у *S. aureus*, что составляло 74,7±5,3%. Среди КОС чаще всего отмечали распространенность признака у *S. epidermidis* и *S. cohnii*, что составляло 53,8±5,4%

и  $51,3 \pm 5,4\%$  соответственно. У остальных видов распространенность данного признака наблюдали в пределах от  $30,5 \pm 3,8\%$  до  $47,4 \pm 4,2\%$ , а средние значения уровня выраженности АнтиНбА от  $0,9 \pm 1,1$  г/л до  $5,7 \pm 2,2$  г/л. Необходимо отметить, что самый высокий уровень выраженности АнтиНбА оказался у *S. aureus*, что составляло  $9,8 \pm 4,6$  г/л, у *E. coli* наблюдали понижение до  $8,3 \pm 3,7$  г/л. У *S. epidermidis* и *S. cohnii* отмечали средние значения уровня выраженности в пределах  $6,8 \pm 3,2$  г/л и  $6,2 \pm 3,0$  г/л, соответственно. Таким образом, в результате проведенных опытов было обнаружено, что большинство исследуемых культур обладали антигемоглобиновой активностью и высокими значениями факторов патогенности.

С помощью СКЛМ проведена сравнительная оценка взаимодействия с эритроцитами штаммов *S. epidermidis* и *E. coli*, отличающихся уровнем выраженности ГА и АнтиНбА. При взаимодействии эритроцитов со штаммом *E. coli* № 15 была выявлена адгезия к поверхности  $91,6 \pm 0,8\%$  эритроцитов. В результате взаимодействия штамма *E. coli* № 17 адгезия к эритроцитам наблюдалась реже ( $p < 0,05$ ), в  $78,8 \pm 2,8\%$  случаях. При изучении внутриэритроцитарного расположения кишечной палочки было выявлено, что в образцах крови со штаммом *E. coli* № 15, инвазия бактерий в эритроцит наблюдалась в 8 раз чаще, чем при взаимодействии эритроцитов со штаммом *E. coli* № 17 ( $34,4 \pm 2,3\%$  против  $4,3 \pm 1,4\%$

«пораженных» эритроцитов соответственно,  $p < 0,05$ ). При взаимодействии штамма *S. epidermidis* № 3 с эритроцитами была выявлена адгезия к поверхности эритроцитов в  $97,4 \pm 1,0\%$  случаев. У штамма *S. epidermidis* № 10 адгезия к эритроцитам наблюдалась реже, в  $65,2 \pm 2,2\%$  случаях (при  $p < 0,05$ ). Штамм *S. epidermidis* № 3 в 10 раз чаще инвазировал в эритроциты, чем штамм *S. epidermidis* № 10 ( $32 \pm 2,3\%$  против  $3,2 \pm 1,2\%$  внутриэритроцитарно расположенных бактерий соответственно,  $p < 0,05$ ).

Таким образом, у штаммов *S. epidermidis* и *E. coli* с высокими значениями АнтиНбА чаще наблюдали адгезию и внутриэритроцитарную инвазию, чем штаммы с низким уровнем АнтиНбА.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бухарин О. В., Стадников А. А., Усвяцов Б. Я., Ханина Е. А. Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии 2006, 4, 25-28.
2. Федорова В. А., Девдариани З. Л. Вестник РАМН 2007, 1, 13-21.
3. Руководство по медицинской микробиологии. Частная медицинская микробиология и этиологическая диагностика инфекций. Книга II. Изд-во БИНОМ, Москва 2012.
4. Шуплова Е. А., Стадников А. А., Фадеев С. Б. БЭ-БиМ 2015, 159 (1), 79-82.
5. Ланг Т. А., Сесик М. Как описывать статистику в медицине. Аннотированное руководство для авторов, редакторов и рецензентов. Практическая медицина, Москва 2011.

### SOME VARIANTS OF PURULENT-INFLAMMATORY DISEASE PATHOGEN INTERACTION WITH HUMAN ERYTHROCYTES

Shchuplova E. A.

*Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, RAS, Orenburg, Russia*

Factors of pathogenicity of strains isolated from patients with purulent-inflammatory diseases were studied. The prevalence and severity of anti-hemoglobin activity (AntiHbA) of the strains was investigated. This feature allows assessing the level of residual hemoglobin in the substrate after exposure to microorganisms and promotes the study of new bacterial pathogenicity factors in the interaction with erythrocytes. It has been established using scanning confocal laser microscopy that the strains *S. epidermidis* and *E. coli* with high levels of AntiHbA and low levels of HA often demonstrated the adhesion to erythrocytes and intra-erythrocyte invasion of strains with low AntiHbA levels and high HA levels.

**Раздел 4**  
**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ**  
**МИКРООРГАНИЗМОВ**  
**В БИОТЕХНОЛОГИИ**

## БИОТРАНСФОРМАЦИЯ $\beta$ -СИТОСТЕРОЛА ИММОБИЛИЗОВАННЫМИ КЛЕТКАМИ РОДОКОККОВ В УСЛОВИЯХ ФОСФАТНО-ЩЕЛОЧНОГО БУФЕРА

Бажутин Г.А.<sup>1</sup>, Ноговицина Е.М.<sup>2</sup>, Гришко В.В.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>ФГБОУ ВПО «Пермский государственный национальный исследовательский университет»; <sup>2</sup>Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН;

<sup>3</sup>Институт технической химии УрО РАН, Пермь, Россия

Исследовано влияние количества носителя на основе технической полимерной ткани с закрепленными клетками родококков на эффективность процесса биотрансформации  $\beta$ -ситостерола в буферном растворе. Установлено, что наиболее высокий уровень конверсии исходного стерола в стигмаст-4-ент-3-он достигается при использовании 10 или 15 единиц носителя с клетками площадью 1 см<sup>2</sup>. Дополнительная инкубация иммобилизованных бактерий в присутствии глюкозы и  $\beta$ -ситостерола до этапа биотрансформации в буфере способствует повышению конверсии субстрата на 2-10%. Максимальная (50%) степень образования стигмаст-4-ен-3-она достигается при использовании культуры *R. erythropolis* ИЭГМ 487.

**Ключевые слова:** иммобилизация,  $\beta$ -ситостерол, родококки, стигмаст-4-ен-3-он.

**Актуальность и цель работы.** Иммобилизация (фиксация) бактерий на твердых поверхностях – один из эффективных способов повышения их каталитической активности. Иммобилизованные клетки по сравнению с незакрепленными обладают повышенной жизнеспособностью и стабильностью в экстремальных условиях внешней среды, устойчивостью к высоким концентрациям токсичных органических соединений и растворителей [1]. В отличие от свободных клеток способность иммобилизованных бактерий к биотрансформации  $\beta$ -ситостерола – ценного источника физиологически активных стероидных соединений исследована недостаточно. Ранее нами было показано [2], что свободные клетки актинобактерий рода *Rhodococcus*, растущие в присутствии н-гексадекана, эффективно (50-95%) трансформируют  $\beta$ -ситостерол с образованием стигмаст-4-ен-3-она, обладающего гипогликемической и вазодепрессивной активностью, а также перспективного для лечения гиперплазии простаты. При использовании иммобилизованных на технической полимерной ткани клеток степень образования

целевого продукта в условиях богатой питательной среды составляет 64% [3].

**Цель настоящего исследования** – подбор оптимальных условий биотрансформации  $\beta$ -ситостерола иммобилизованными клетками родококков в условиях фосфатно-щелочного буфера.

**Материалы и методы.** В работе использовали штаммы *R. erythropolis* ИЭГМ 766, ИЭГМ 487 и *Rhodococcus ruber* ИЭГМ 233 из Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов (официальный акроним ИЭГМ, номер во Всемирной федерации коллекций культур 768, [www.iegm.ru/iegmcol](http://www.iegm.ru/iegmcol)).

Иммобилизованные клетки родококков получали с использованием в качестве носителя технической полимерной ткани (ткань техническая из нитей СВМ арт. 56313 "Н" ТУ 17 ВНИИПХВ-350-88 ООО «УкрматериалИнвест», Харьков, Украина). В эксперименте использовали инкубационную среду Wilmańska состава (г/л):  $K_2HPO_4 \times 3H_2O$  – 1,0;  $(NH_4)2HPO_4$  – 1,5;  $MgSO_4 \times 7H_2O$  – 0,1;  $FeSO_4 \times 7H_2O$  – 0,01;  $ZnSO_4 \times 7H_2O$  – 0,002; глюко-



за – 5,0; дрожжевой экстракт – 10,0. Дополнительно в качестве индуктора вносили 0,2 г/л  $\beta$ -ситостерола в виде 10% раствора в изопропанол. Через 2 сут родококки отделяли от инкубационной среды центрифугированием при 4000 об/мин в течение 10 мин и дважды промывали фосфатно-щелочным буфером (здесь и далее:  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$ , pH 7). Затем к 50 мл приготовленной в этом же буфере клеточной суспензии ( $\text{OD}_{600}$  1,0) добавляли 5 фрагментов ткани площадью по 1  $\text{cm}^2$ ). Имобилизацию проводили в течение 5 сут на орбитальной качалке (130 об/мин) при температуре 28°C. Носители с клетками промывали фосфатно-щелочным буфером в стерильных условиях.

Биотрансформацию  $\beta$ -ситостерола проводили в буфере в течение 3 сут. Исходный стерол добавляли в концентрации 2 г/л в виде 10% раствора в изопропанол. В отдельных экспериментах использовали иммобилизованные клетки, предварительно выдержанные в течение 2 сут в глюкозосодержащей среде Wilmańska с добавлением 0,2 г/л  $\beta$ -ситостерола. На 50 мл среды добавляли 10, 15 или 20 фрагментов технической полимерной ткани (1  $\text{cm}^2$ ) с клетками. Биотрансформацию проводили в течение 3 сут.

Продукты бактериального окисления  $\beta$ -ситостерола экстрагировали этилацетатом. Качественный и количественный состав продуктов биотрансформации определяли методом хромато-масс-спектрометрии (Agilent 6890/5973N (кварцевая колонка HP-5MS SN US 15189741-1) «Agilent technology» (США). Эксперименты проводили в 3-кратной повторности. Статистическую обработку результатов осуществляли с использованием программы Excel 2003.

**Результаты.** Выбор фосфатно-щелочного буфера в качестве среды обусловлен задачей оптимизировать процесс биотрансформации  $\beta$ -ситостерола иммобилизованными клетками родококков в неростовых условиях, что позволит избежать обрастания носителя биомассой [4], увеличить концентрацию исходного субстрата и сократить продолжительность процесса [5].

По нашим данным, свободные нерастущие клетки родококков в условиях фосфатно-щелочного буфера способны окислять не более

10%  $\beta$ -ситостерола. В результате исследования влияния количества иммобилизованного биокатализатора на процесс биотрансформации исходного стерола установлено, что наиболее эффективная (до 48,6%) степень образования стигмаст-4-ен-3-она достигается при использовании 15 фрагментов ткани (общая площадь поверхности 15  $\text{cm}^2$ ) с закрепленными бактериями на 50 мл среды. В данных условиях максимальную активность проявил штамм *R. erythropolis* ИЭГМ 766.

Оптимизировать условия процесса биотрансформации исходного стерола родококками позволила дополнительная инкубация иммобилизованных бактерий в присутствии глюкозы и  $\beta$ -ситостерола в качестве индуктора целевой активности. Установлено, что максимальная (50%) степень образования стигмаст-4-ен-3-она достигается при использовании культуры *R. erythropolis* ИЭГМ 487. При этом повышение количества биокатализатора свыше 10 единиц (фрагментов ткани с клетками) приводит к снижению трансформирующей активности на 10–24%.

Таким образом, определены оптимальные условия соотношения количества носителя с иммобилизованными клетками и объема буферного раствора.

Исследования поддержаны грантами Президента РФ «Ведущие научные школы» (НШ-4607.2014.4), Российского фонда фундаментальных исследований и Министерства промышленности, инноваций и науки Пермского края (№ 14–04–96005-р\_урал\_a).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Martins S. C. S., Martins C. M., Fiúza L. M. C. C., Santaella S. T. African J Biotechnol 2013, 12 (28), 4412-4418.
2. Гришко В. В., Ноговицина Е. М., Ившина И. Б. Химия природных соединений 2012, 3, 390-392.
3. Ноговицина Е. М., Бажутин Г. А., Гришко В. В. Вестник Башкирского университета 2014, 19 (3), 858-861.
4. Ivshina I. B., Kuyukina M. S., Krivoruchko A. V., P lekhov O. A., Naimark O. B., Podorozhko E. A., Lo zinsky V. I. Appl Microbiol Biotechnol 2013, 97, 5315-5327.
5. Wang Z., Zhao F., Chen D., Li D. Process Biochem 2006, 41 (3), 557-561.

## $\beta$ -SITOSTEROL BIOTRANSFORMATION BY IMMOBILIZED RHODOCOCCAL CELLS IN PHOSPHATE ALKALINE BUFFER

Bazhutin G. A.<sup>1</sup>, Nogovitsina E. M.<sup>2</sup>, Grishko V. V.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Perm State National Research University; <sup>2</sup>Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, RAS; <sup>3</sup>Institute of Technical Chemistry, RAS, Perm, Russia

The correlation between the amount of a technical polymer fabric-based carrier with immobilized rhodococcal cells and the efficiency of  $\beta$ -sitosterol biotransformation in a buffer solution was studied. The highest sterol transformation activity was achieved with 10 or 15 units of carrier (unit area, 1 cm<sup>2</sup>) with adsorbed rhodococci. Additional incubation of immobilized cells in the presence of glucose and  $\beta$ -sitosterol slightly (2–10%) increased the substrate conversion. The highest (50%) level of stigmasterol-4-en-3-one formation was obtained using *R. erythropolis* IEGM 487.

## АМИДАЗОСОДЕРЖАЩИЙ ШТАММ *ALCALIGENES FAECALIS* 2 ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ПИРИДИНКАРБОНОВЫХ КИСЛОТ

Васильев Д. М.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>ФГБУН Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН;  
<sup>2</sup>ФГБОУ ВПО Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

*Alcaligenes faecalis* 2, изолированный из активного ила биологических очистных сооружений, проявляет амидазную активность по отношению к амидам пиридинкарбонových кислот при росте на ацетамиде (1 г/л) как единственном источнике углерода и азота, и может быть использован в качестве биокатализатора для получения пиридинкарбонových кислот. Максимум амидазной активности по отношению к никотинамиду проявляется на третьи сутки культивирования. При проведении трехчасовой конверсии 100 мМ раствора никотинамида трехсуточной культурой *A. faecalis* 2 был получен раствор с содержанием никотиновой кислоты 0,77 мг/мл.

**Ключевые слова:** амидазная активность, никотиновая кислота, 3-цианопиридин, акриламид, нитрилгидролизующие бактерии.

**Актуальность и цель работы.** Путем биоконверсии 3-цианопиридина и никотинамида может быть получена никотиновая кислота, которая является витамином, предшественником фармацевтических препаратов и различных химических соединений. Витамины группы РР (никотинамид и никотиновая кислота) – необходимый элемент питания и широко распространенное лекарственное средство. Изоникотиновая кислота представляет собой промежуточный продукт синтеза противотуберкулезных препаратов группы гидразида изоникотиновой кислоты (изониазид, фтивазид, метаизид и др.), антидепрессантов –

ингибиторов моноаминоксидазы, хинуклидиновых лекарственных средств (фенкарол, оксидин, ацеклидин); пиколиновая кислота является предшественником промежуточного продукта синтеза димеколина – 6-метилпиколиновой кислоты [1].

Представляет интерес получение этих пиридинкарбонových кислот биотехнологическим путем с помощью нитрилгидролизующих бактерий. Так, пиридинкарбонových кислоты могут быть получены как одностадийным гидролизом цианопиридинов нитрилизацией микроорганизмов, так и двухстадийной трансформацией нитрилгидратазой до амидов с последующим

гидролизом амидазой. Двустадийный гидролиз может осуществляться смешанной бактериальной культурой, штаммы которой обладают либо высокой нитрилгидратазной, либо выраженной амидазной активностью. Известны высокопродуктивные бактериальные штаммы, обладающие нитрилгидратазной активностью (*Rhodococcus rhodochrous* J1 [2], *R. rhodochrous* M8 [3]), и используемые в биотехнологической промышленности. В то же время, практически нет сведений о получении штаммов микроорганизмов, стабильно проявляющих амидазную активность. Поэтому поиск и селекция таких штаммов остается актуальной, а изучение особенностей их роста с целью получения высокоактивного биокатализатора имеет практический интерес.

**Цель работы:** изучение зависимости проявления амидазной активности *Alcaligenes faecalis* 2 от времени культивирования.

**Материалы и методы.** Объектом исследования явился штамм *Alcaligenes faecalis* 2, обладающий амидазной активностью по отношению к ароматическим амидам, изолированный нами ранее из активного ила биологических очистных сооружений г. Перми.

Суспензию *A. faecalis* 2 выращивали в колбах объемом 1 л в 600 мл среды N с добавлением ацетамида в концентрации 1 г/л в качестве единственного источника углерода и азота. Суспензию культивировали в течение 4 суток, посуточно отбирая пробы для определения активности ферментов метаболизма нитрилов и оптической плотности суспензии.

Для определения активности ферментов проводили трансформацию 3-цианопиридина, никотинамида, акрилонитрила и акриламида. Трансформацию проводили в 10 мМ калийнатрий фосфатного буфера, рН 7.2, при начальной концентрации субстратов 100 мМ, при 30°C в течение 180 мин и останавливали замораживанием. Продукты реакции анализировали методами газовой хроматографии и ВЭЖХ. Удельную активность фермента определяли как количество продукта реакции в мкмоль, образуемое за 1 минуту биомассой бактерий, соответствующей 1 мг сухого веса. Рост культур бактерий оценивали по изменению оптической плотности суспензии клеток при  $\lambda=540$  нм. Соответствие единицы оптической плотности весу сухих клеток определяли взвешиванием на аналитических весах предварительно высушенной

биомассы из 1 мл суспензии известной оптической плотности.

**Результаты.** Изучены особенности роста *A. faecalis* 2 и проявления его каталитической активности в зависимости от времени культивирования. Определено, что масса клеток равномерно нарастала к четвертым суткам культивирования и составила  $1 \pm 0,07$  мг/мл. Амидазная активность по отношению к акриламиду достигла своего пика ко вторым суткам роста суспензии и составила  $0,15 \pm 0,006$  мкм/мг/мин. При проведении конверсии акриламида максимальная концентрация акриловой кислоты была получена при трансформации клетками двухсуточной суспензии и составила  $5,51 \pm 0,5$  мг/мл. При трансформации акрилонитрила на протяжении всего периода роста суспензии наблюдалось постепенное снижение концентрации субстрата без заметного увеличения продуктов реакции.

Амидазная активность клеток по отношению к никотинамиду нарастала, начиная с первых суток роста, от  $0,002 \pm 0,0002$  до  $0,024 \pm 0,004$  мкм/мг/мин к третьим суткам. При проведении конверсии никотинамида клетками трехсуточной суспензии в течение трех часов был получен раствор с содержанием никотиновой кислоты  $0,77 \pm 0,05$  мг/мл. Концентрация никотиновой кислоты при проведении конверсии клетками одно-, двух- и четырехсуточной суспензии за то же время составила  $0,50 \pm 0,20$ ,  $0,70 \pm 0,08$  и  $0,54 \pm 0,04$  мг/мл соответственно. Нитрилгидролизующей активности в реакции трансформации 3-цианопиридина обнаружено не было.

Таким образом, для получения активного биокатализатора трансформации амидов до соответствующих пиридинкарбоновых кислот, суспензия штамма *A. faecalis* 2 была выращена на среде с ацетамидом (1 г/л) в качестве единственного источника углерода и азота, причем оптимальная продолжительность культивирования составляла трое суток.

Работа поддержана программой УМНИК (2013 г, Пермь).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Яхонтов Л.М., Глушков Р.Г., Под ред. Натрадзе А.Г. Синтетические лекарственные средства. Медицина, Москва 1983.
2. Kobayashi, M., Nagasawa T., Yamada H. Trends Biotechnol 1992, 10, 402-408.
3. Дебабов В.Г., Яненко А.С. Обзорный журнал по химии 2011, 1 (4), 376-394.

## STRAIN *ALCALIGENES FAECALIS* 2 CONTAINING AMIDASE FOR OBTAINING PYRIDINECARBOXYLIC ACIDS

Vasil'ev D.M.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms UB RAS; <sup>2</sup>Perm State National Research University, Perm, Russia

Strain *Alcaligenes faecalis* 2, isolated from an activated sludge from biological treatment plants, exhibits amidase activity towards amides of pyridinecarboxylic acids with growth on acetamide (1 g/L) as the sole source of carbon and nitrogen, and can be used as a biocatalyst for pyridinecarboxylic acids. Maximum amidase activity in relation to nicotinamide is shown on the third day of cultivation. During the three-hour conversion of 100 mM nicotinamide using three-day culture *A. faecalis* 2 a solution containing nicotinic acid 0.77 mg / ml was obtained.

## ОПТИМИЗАЦИЯ СРЕД КУЛЬТИВИРОВАНИЯ НИТРИЛУТИЛИЗИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ

Васильев Д. М.<sup>1,2</sup>, Оленева М. А.<sup>2</sup>, Максимова Ю. Г.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>ФГБУН Институт экологии и генетики УрО РАН; <sup>2</sup>ФГБОУ ВПО Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

Оптимизированная среда роста для штаммов нитрилгидролизующих бактерий *Acinetobacter guillouiae* 11h и *Pseudomonas putida* il представляет собой минеральную солевую основу с ацетамидом в концентрации 1 г/л в качестве единственного источника углерода и азота. Максимум активности клеток *A. guillouiae* 11h при трансформации акриламида, никотирамида и 3-цианопиридина составил 13,55, 1,12 и 1,6 мкмоль/мг/мин и наблюдался на третьи, вторые и первые сутки соответственно. Активность амидазы клеток *P. putida* il составила 0,11 и мкмоль/мг/мин при конверсии акриламида. Максимум активности по 3-цианопиридину наблюдали в первые, а по акриламиду – на четвертые сутки роста суспензии.

**Ключевые слова:** оптимизация, питательные среды, активность фермента, нитрилутилизующие бактерии.

**Актуальность и цель работы.** На сегодняшний день оптимизация химических производств является актуальной задачей, большое внимание уделяется разработке и внедрению биотехнологических методов синтеза химических соединений. Привлекательность биокаталитических технологий заключается в способности ферментов трансформировать органические вещества в более мягких по сравнению с химическими процессами условиях (невысокие температура и давление) [1]. Так как около 60% стоимости биотехнологического продукта приходится на компоненты среды, а субстрат влияет на скорость роста микроор-

ганизмов, выход биомассы и синтез ферментов, оптимизация среды культивирования является первоочередной задачей [2].

**Цель работы** – оптимизировать среды культивирования штаммов нитрилутилизующих бактерий, выделенных из активного ила биологических очистных сооружений г. Перми.

**Материалы и методы.** Объектом исследования явились штаммы *Acinetobacter guillouiae* 11h и *Pseudomonas putida* il, изолированные нами ранее из активного ила биологических очистных сооружений г. Перми.

Суспензию *A. guillouiae* 11h и *P. putida* il выращивали в лунках 96-луночного полистиро-

лового планшета в 150 мкл среды N с добавлением источников углерода и азота в различных сочетаниях и концентрациях (г/л): ацетамид (1); ацетамид (1) + хлорид аммония (5,3); ацетонитрил (1); ацетонитрил (1) + хлорид аммония (5,3); ацетат натрия (10) + хлорид аммония (5,3); глюкоза (1) + хлорид аммония (5,3); лактоза (1) + хлорид аммония (5,3). Для выращивания *A. guillouiae* 11h дополнительно использовали среды: ацетамид (1) + ацетат натрия (10); ацетонитрил (1) + ацетат натрия (10); мальтоза (1) + хлорид аммония (5,3). Для *P. putida* il дополнительно использовали среду сахароза (1) + хлорид аммония (5,3).

Рост суспензии оценивали по изменению оптической плотности, измеренной при 540 нм на планшетном ридере Tecan infinite M200 pro (Швейцария). Параметры роста вычисляли следующим образом: удельная скорость роста,  $\mu = dx/dt \cdot 1/x$ , где  $\mu$  – прирост биомассы в единицу времени на единицу биомассы,  $x$  – начальная биомасса (мг/мл),  $t$  – время (ч); урожай культуры – максимальное количество клеток (мг/мл); экономический коэффициент,  $Y = (X/C) \cdot 100\%$ , где  $X$  – количество образовавшейся биомассы (мг/мл),  $C$  – количество потребленного субстрата (мг/мл).

Для определения зависимости активности ферментов метаболизма нитрилов от срока культивирования суспензии проводили посуточный отбор проб с последующей трансформацией алифатических и ароматических нитрилов и амидов. Трансформацию проводили в 10мл калийнатрий фосфатного буфера, рН 7,2, при начальной концентрации субстратов 100 мМ, при 30°C в течение 60 мин и оставляли замораживанием. Продукты реакции анализировали методами газовой хроматографии и ВЭЖХ. Удельную активность фермента определяли как количество продукта реакции в мкмоль, образуемое за 1 минуту биомассой бактерий, соответствующей 1 мг сухого веса.

**Результаты.** Оптимизированы питательные среды для культивирования *A. guillouiae* 11h и *P. putida* il. Наибольший урожай клеток *A. guillouiae* 11h получили при выращивании на среде с ацетамидом в концентрации 1 г/л. При использовании ацетамида в качестве единственного источника азота и углерода, либо при его использовании в качестве источника только углерода с дополнительным источником азота – хлористым аммонием или как единственным источником азота, но с до-

полнительным источником углерода – ацетатом натрия, урожай клеток составляет 0,52, 0,49 и 0,60 мг/мл сухих клеток соответственно. При замене ацетамида на ацетонитрил был получен урожай, равный 0,1, 0,17 и 0,32 мг сухих клеток/мл. Урожай бактериальной массы при использовании сахаров был одинаков и составил 0,16 мг/мл. При добавлении ацетата натрия в сочетании с хлористым аммонием урожай составил 0,23 мг/мл сухих клеток. Наибольший экономический коэффициент был отмечен при выращивании на среде с использованием ацетонитрила и хлористого аммония и достигал 17,36%. Данный показатель при выращивании культуры на средах с сахарами составил 16%, на остальных средах – от 3,7 до 9,8%.

Наибольший урожай клеток *P. putida* il, равный 0,46 мг/мл, получили на среде с ацетамидом и хлористым аммонием. На средах с сахарозой и глюкозой урожай составил 0,08 мг/мл. Самый низкий урожай был получен при использовании ацетонитрила в качестве единственного источника углерода и азота – 0,03 мг/мл. Добавление к ацетонитрилу хлористого аммония повысило этот показатель до 0,08 мг/мл, тогда как добавление хлористого аммония к ацетамиду понижало урожай с 0,46 мг/мл до 0,09 мг/мл. Наибольший экономический коэффициент был получен при выращивании культуры на среде с глюкозой и хлористым аммонием – 11,17%. На среде с добавлением ацетамида и хлористого аммония, а также на среде с ацетонитрилом в качестве единственного источника углерода и азота экономический коэффициент составил 1,48 и 3,05% соответственно, а при росте на остальных средах – от 0,08 до 0,09%.

Способность к трансформации нитрилов и амидов у *A. guillouiae* 11h наблюдалась только при росте на ацетамиде. Активность по акриламиду, никотинамиду и 3-цианопиридину составила 13,55, 1,12 и 1,6 мкмоль/мг/мин соответственно, с максимумом на третьи, вторые и первые сутки соответственно. При культивировании *P. putida* il на среде с ацетамидом в качестве единственного источника углерода и энергии активность по акриламиду нарастала равномерно и к четвертым суткам роста составила 0,11 мкмоль/мг/мин, а пик активности по 3-цианопиридину наблюдали в первые сутки роста суспензии. 3-цианопиридин практически полностью

трансформировался в 98 мМ раствор никоти-  
намида. Равномерное снижение концентрации  
акрилонитрила не сопровождалось образова-  
нием акриловой кислоты.

Таким образом, оптимальным источником  
углерода для накопления максимальной био-  
массы и проявления нитрил- и амидгидро-  
лизующей активности изученных штаммов  
являлся ацетамид, хотя экономический коэф-

фициент при использовании этого субстрата  
оставался невысоким.

Работа выполнена в рамках государствен-  
ного задания № 6.2635.2014/К.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Яненко А. С., В мире науки 2006, 8, 78-80.
2. Полтавская, С.В., Козулина Т. Н., Сингирцев И. Н.,  
Козулин С. В., Биотехнология 2004, 1, 62-70.

### OPTIMIZATION OF CULTURE MEDIUM OF NITRILE-UTILIZING BACTERIA

Vasil'ev D.M.<sup>1,2</sup>, Oleneva M.A.<sup>2</sup>, Maksimova Yu.G.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms UB RAS; <sup>2</sup>Perm State  
National Research University, Perm, Russia

The optimized growth medium for nitrile-utilizing bacteria *Acinetobacter guillouiae* 11h and *Pseudo-  
monas putida* il is a mineral salt base with acetamide in concentration of 1 g/L as the sole source of carbon  
and nitrogen. Maximum activity of *A. guillouiae* 11h cells in the transformation of acrylamide, nicotin-  
amide and 3-цанопыридин was 13.55, 1.12 and 1.6  $\mu\text{mol}/\text{mg}/\text{min}$  and was observed on the third, second  
and first day, respectively. Amydase activity of *P. putida* il cells under conversion of acrylamide was 0.11  
 $\mu\text{mol}/\text{mg}/\text{min}$ . Maximum activity under 3-цанопыридин conversion was observed on the first day of  
growth and acrylamide – on the fourth day.

### ЭКСПРЕСС-МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ СТЕРЕОСЕЛЕКТИВНОСТИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ АМИДАЗ

Горбунова А. Н.<sup>1,2</sup>, Максимова Ю. Г.<sup>1,2</sup>, Максимов А. Ю.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН; <sup>2</sup>Пермский  
государственный национальный исследовательский университет,  
Пермь, Россия

Предложен экспресс-метод определения стереоселективности бактериальных амидаз,  
основанный на реакции трансформации рацемического лактамида с последующим энзи-  
матическим определением соотношения D- и L-изомеров молочной кислоты. Метод адап-  
тирован к измерениям в 96-луночных планшетах и позволяет проводить быстрый скри-  
нинг микроорганизмов, обладающих амидазной активностью, с целью поиска штаммов,  
амидазы которых проявляют наибольшую стереоселективность.

*Ключевые слова:* ускоренный скрининг, стереоселективные амидазы, биокатализатор.

**Актуальность и цель работы.** Для поиска  
биокатализаторов стереоселективного гидро-  
лиза органических веществ необходим скри-  
нинг бактерий, способных трансформировать  
рацемические субстраты в продукт с высокой  
энантиомерной чистотой. При этом наличие

стереоселективной активности продуцента  
определяется в ходе хроматографического  
анализа [1]. Методы хроматографии незаме-  
нимы, когда необходимо строго идентифици-  
ровать искомое вещество, однако они имеют  
ряд существенных недостатков. К ним следует

отнести трудоемкость, сложность, длительность анализа, а также необходимость использования дорогостоящего оборудования и привлечения высококвалифицированного персонала [2,3]. Поэтому создание нового подхода к определению стереоселективности ферментов выделяемых штаммов является востребованной и актуальной задачей.

Амидазы (ациламидамидогидролазы, КФ 3.5.1.4) – ферменты, которые катализируют гидролиз амидов с образованием соответствующих карбоновых кислот и аммония [4]. Основным источником данных ферментов являются клетки бактерий. Биокатализаторы на основе бактериальных клеток с высокой амидазной активностью могут быть использованы при получении различных карбоновых кислот (в том числе, аммонийных солей акриловой и никотиновой кислот) и нестероидных противовоспалительных препаратов, а изолированные стереоселективные амидазы – для синтеза ряда коммерчески значимых продуктов в оптически чистой форме, например, стереоизомеров аминокислот и их производных [5].

**Цель работы** – разработка экспресс-метода определения стереоселективности бактериальных амидаз.

**Материалы и методы.** Объектом исследования являлись штаммы бактерий, обладающие амидазной активностью, выделенные в лаборатории молекулярной микробиологии и биотехнологии ИЭГМ УрО РАН из образцов антропогенно-загрязненной почвы.

Штаммы бактерий, перспективные для стереоселективной биотрансформации, выделяли методом прямого высева на чашки Петри с агаризованной минеральной средой N, содержащей селективный субстрат – лактамид в концентрации 10 мМ. Предварительную идентификацию штаммов, проявляющих амидазную активность, проводили путем ПЦР-анализа с праймерами к генам 16S рРНК, сконструированными на основе последовательностей, представленных в базе данных GenBank и синтезированными ООО «Евроген», г. Москва. Амидазную активность бактериальной суспензии и ферментного препарата предварительно оценивали спектрофотометрически (Ultraspec 3000) по возрастанию оптической плотности реакционной среды при проведении минутной реакции с акриламидом в качестве субстрата при  $\lambda=230$  нм.

**Результаты.** Разработанный метод основан на проведении реакции трансформации 0.05 М раствора рацемического лактамида суспензией клеток тестируемых бактериальных штаммов, обладающих амидазной активностью. Реакцию проводили в течение 1 ч при 22°C, реакционную смесь отделяли от биокатализатора центрифугированием в течение 10 мин при 13000 g и анализировали при использовании набора реактивов для энзиматического определения D- и L-молочной кислоты (“R-Biopharm”, Германия). Энзиматический метод заключается в окислении энантиомеров молочной кислоты до пирувата при функционировании стереоспецифических ферментов – D- и L-лактат дегидрогеназы, сопровождающимся образованием НАДФ<sup>+</sup>, стехиометрическим количеством изомеров. Увеличение НАДФ<sup>+</sup> определяли спектрофотометрически при 340 нм.

Методика энзиматического определения изомеров молочной кислоты была адаптирована для проведения анализа в микрообъемах на планшетном ридере Tecan infinite M200 pro (“Tecan”) с использованием 96-луночных иммунологических планшетов, что позволяет одновременно протестировать большое количество проб с минимальными затратами реактивов. Стереоселективность амидаз исследуемых штаммов оценивали по энантиомерному избытку реакции, рассчитанному по формуле:  $ee = ([X] - [Y]) / ([X] + [Y]) \times 100\%$ , где X и Y – доли энантиомеров.

С использованием разработанного экспресс-метода провели ускоренный скрининг 75 штаммов амидгидролизующих бактерий. Было показано, что 45 штаммов гидролизуют лактамид без стереоселективности, 20 гидролизуют D-изомер лактамида и 10 – L-изомер. Как наиболее перспективные для стереоселективной трансформации амидов были выбраны две культуры: *Rhodococcus rhodochrous* 4-1 и *Arthrobacter* sp. 6-1, гидролизующие D-, L-лактамид с образованием D-молочной кислоты с максимальным энантиомерным избытком 44±3.5 и 43±2.8% соответственно, и проявляющие активность 5.8±0.43 и 1.6±0.12 мкмоль/мг/мин соответственно.

Таким образом, для выявления штаммов бактерий, обладающих стереоселективными амидазами, был разработан экспресс-метод тестирования, основанный на реакции транс-

формации рацемического лактамида и применении энзиматического метода определения D- и L-молочной кислоты, адаптированного к измерениям в 96-луночном планшете. Данный метод позволяет ускорить процесс отбора перспективных для биотехнологии штаммов, которые в дальнейшем могут быть использованы для биокаталитической трансформации амидов в органические кислоты высокой оптической чистоты.

Работа выполнена в рамках государственного задания № 6.2635.2014/К.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Потапов В. М. Стереохимия. Химия, Москва 1988.
2. Алленмарк С. Хроматографическое разделение энантиомеров. Мир, Москва 1991.
3. Шаповалова Е. Н., Пирогов А. В. Хроматографические методы анализа. МГУ им. Ломоносова, Москва 2007.
4. Перцович С. И., Гуранда Д. Т., Подчерняев Д. А., Яненко А. С., Швядас В. К. Биохимия 2005, 11, 1556-1565.
5. Chen J., Zheng R.- C., Zheng Y.- G., Shen Y.- C. *Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology* 2009, 113, 33-77.

## THE EXPRESS METHOD FOR DETERMINATION OF THE STEREOSELECTIVITY OF BACTERIAL AMIDASES

Gorbunova A. N.<sup>1,2</sup>, Maksimova Yu. G.<sup>1,2</sup>, Maksimov A. Y.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, RAS;*

<sup>2</sup>*Perm State National Research University, Perm, Russia*

The express method for determination of the stereoselectivity of bacterial amidases was offered. It is based on the reaction of transformation of racemic lactamide and followed by enzymatic determination of concentrations of D- and L-isomers of lactic acid. A method is adapted to measuring in small 96-well plates and allows conducting a rapid screening of amidase producing bacteria for receiving the stereoselective biocatalysts.

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ФАГОВЫХ АНТИТЕЛ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ МИКРОБНЫХ КЛЕТОК МЕТОДОМ ЭЛЕКТРОАКУСТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

Гулий О. И.<sup>1,2,3</sup>, Зайцев Б. Д.<sup>4</sup>, Шихабудинов А. М.<sup>4</sup>,  
Павлий С. А.<sup>5</sup>, Караваева О. А.<sup>1</sup>, Дыкман Л. А.<sup>1,3</sup>,  
Староверов С. А.<sup>1,2,3</sup>, Игнатов О. В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН;* <sup>2</sup>*Саратовский государственный аграрный университет им. Н. И. Вавилова;* <sup>3</sup>*Саратовский научно-исследовательский ветеринарный институт РАН;* <sup>4</sup>*Саратовский филиал Института радиотехники и электроники РАН;* <sup>5</sup>*Саратовский государственный университет им. Н. Г. Чернышевского, Саратов, Россия*

Получены фаговые антитела к бактериальным клеткам штамма *Azospirillum brasilense* Sp245 и продемонстрирована возможность их применения для детекции микробных клеток с помощью пьезоэлектрического резонатора с поперечным электрическим полем. Найден предел возможного определения концентрации микробных клеток, который составляет  $10^3$  кл/мл. Показано, что детекция клеток *A. brasilense* Sp245 с помощью фаговых антител возможна в присутствии посторонних культур. Полученные результаты демонстрируют возможность разработки биологического датчика для количественной детекции микробных клеток.

**Ключевые слова:** *Azospirillum brasilense* Sp245, фаговые антитела, пьезоэлектрический резонатор с поперечным электрическим полем, детекция.



**Актуальность и цель работы.** Взаимодействие антиген-антитело широко применяется в сенсорных системах для детектирования различных видов микроорганизмов [1]. Традиционно биологическими компонентами, используемыми для определения клеток, являются поликлональные и моноклональные антитела (АТ), которые широко применяются в производстве диагностических тест-систем. В последнее время для решения подобных задач в молекулярной биологии стали использоваться генно-инженерные технологии клонирования узнающих фрагментов – гипервариабельных участков иммуноглобулинов, которые являются более дешевыми и могут конкурировать по селективности с гибридными технологиями. К такому методу относится технология фагового дисплея, созданная Джорджем Смитом [2]. Впервые возможность получения одноцепочечных последовательностей, составленных из вариабельных доменов АТ, в составе гибридного белка оболочки фага, была продемонстрирована Мак Кафферти с соавт. [3].

Методы электрофизического анализа находят широкое применение для решения вопросов детекции микробных клеток. В частности, акустические методы анализа привлекают все большее внимание исследователей для анализа биологических взаимодействий, поскольку характеризуются большой чувствительностью и быстротой анализа. Интерес вызывают пьезоэлектрические резонаторы с поперечным электрическим полем, которые в отличие от традиционных резонаторов с продольным полем более чувствительны к контактирующей жидкости, поскольку реагируют на изменение, как ее вязкости, так и проводимости. Целью работы являлось получение фаговых АТ к клеткам модельного штамма *A. brasilense* Sp245 и исследование возможности их детекции с помощью пьезоэлектрического резонатора с поперечным электрическим полем.

**Методы исследования.** В работе использовали бактериальные клетки *Azospirillum brasilense* Sp245, *Escherichia coli* штаммов XL-1 и BL-Ril, полученные из коллекции микроорганизмов ИБФРМ РАН. Изучение изменения физических параметров суспензии клеток проводилось по методу, описанному в работе [4]. Аффинная селекция миниантител из фаговой библиотеки проводилась по методике, представленной в работе [5]. Частотные зависимо-

сти реальной и мнимой частей электрического импеданса резонатора, контактирующего с исследуемой суспензией, которые приведены на рисунках, строились по средним значениям, полученным в результате проведения 5 независимых идентичных экспериментов. Для статистической обработки использовали Microsoft Excel 2000.

**Результаты.** Для анализа биологических взаимодействий широко используются акустические методы, принцип действия которых основан на регистрации биоспецифических реакций в жидкой суспензии, контактирующей с поверхностью пьезоэлектрика. При взаимодействии бактериальных клеток и специфических АТ происходит изменение вязкоупругих и электрических свойств жидкости. При контакте этой суспензии со свободной поверхностью пьезоэлектрического резонатора с поперечным полем эти изменения приводят, как к сдвигу его резонансной частоты, так и к изменению частотных зависимостей электрического импеданса. Последний параметр является наиболее чувствительным для детекции бактериальных клеток в суспензии, и именно он использовался при проведении исследований. В экспериментах использовался биологический датчик на основе резонатора с поперечным возбуждающим электрическим полем, разработанный в СФИРЭ им. В. А. Котельникова (г. Саратов), эксперименты проводились совместно с сотрудниками данного института в лаборатории физической акустики. Исследовалась возможность детекции бактериальных клеток *A. brasilense* Sp245 непосредственно в жидкой фазе при их взаимодействии со специфическими фаговыми АТ.

Вначале были получены фаговые антитела к бактериальным клеткам *A. brasilense* Sp245. Чувствительность полученных фаговых АТ определяли методом дот-анализа. Титр АТ, определенный методом ИФА, составил 1: 8000. Затем проводились исследования с помощью указанного выше акустического биологического датчика. Информационным сигналом датчика служили частотные зависимости реальной и мнимой частей электрического импеданса, которые измерялись с помощью измерителя S-параметров в частотном диапазоне 6-7 МГц. Анализируемая суспензия контактировала со свободной от электрических электродов стороной резонатора. Регистрировали изменения указанных выше зависимостей

при взаимодействии клеток *A. brasilense* Sp245 в суспензии с разным количеством фаговых АТ. Установлено, что частотные зависимости реальной и мнимой частей электрического импеданса резонатора, нагруженного суспензией клеток *A. brasilense* Sp245 с фаговыми АТ, значительно отличаются от зависимостей резонатора с контрольной суспензией клеток без АТ. Найден предел возможного определения концентрации микробных клеток, который составляет  $10^3$  кл/мл. Для контроля специфичности взаимодействия фаговых АТ проводилась электронно-микроскопическая идентификация взаимодействия клеток *A. brasilense* Sp245 с используемыми АТ, мечеными коллоидным золотом. Анализ электронной микрофотографии показал, что АТ с коллоидным золотом взаимодействуют с клетками азоспириллы, скопление маркера происходит по всей поверхности клетки. Установлено, что в присутствии посторонних культур *E. coli* штам-

мов XL-1 и BL-Ril, также возможна детекция клеток *A. brasilense* Sp245.

Представленные результаты показывают перспективность анализа микробных суспензий с помощью пьезоэлектрического резонатора с поперечным электрическим полем, и демонстрируют возможность разработки биологического датчика для количественной детекции микробных клеток.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Vaughan R.D., O'Sullivan C.K., Cuilbault G.G. *Enzyme Microb Techn* 2001, 29, 635-638.
2. Smith G.P. *Science* 1985, 228, 1315-1317.
3. McCafferty J., Griffiths A., Winter G., Chiswell D. *Nature* 1990, 348, 552-554.
4. Zaitsev B.D., Kuznetsova I.E., Shikhabudinov A.M., Ignatov O.V., Guliy O.I. *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics and Frequency Control* 2012, 59, 963-969.
5. Charlton K.A., Moyle S., Porter A.J.R., Harris W.J.J. *Immunol* 2000, 164, 6221-6229.

### PHAGE ANTIBODIES AND THEIR USE FOR DETECTION OF MICROBIAL CELLS BY USING ELECTRO-ACOUSTIC SENSOR

Guliy O.I.<sup>1,2,3</sup>, Zaitsev B.D.<sup>4</sup>, Shikhabudinov A.M.<sup>4</sup>,  
Pavliy S.A.<sup>5</sup>, Karavaeva O.A.<sup>1</sup>, Dykman L.A.<sup>1,3</sup>,  
Staroverov S.A.<sup>1,2,3</sup>, Ignatov O.V.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Biochemistry & Physiology of Plants & Microorganisms, Russian Academy of Sciences;

<sup>2</sup>Saratov State Agrarian University; <sup>3</sup>Scientific Research Veterinary Institute, Russian Academy of Sciences; <sup>4</sup>Saratov Branch, Institute of Radio Engineering and Electronics, Russian Academy of Sciences; <sup>5</sup>Saratov State University, Saratov, Russia

The phage mini-antibodies to bacterial cells of strain *Azospirillum brasilense* Sp245 were obtained and their possibility for detection of microbial cells by means of a lateral field excited piezoelectric resonator was studied. We have shown that the concentration limit of a possible determination of the microbial cells in their interaction with the mini-antibodies is equal to  $10^3$  cells/ml. It has been also found that the detection of cells of *A. brasilense* Sp245 using the mini-antibodies is possible even in the presence of other cultures. Our results show the possibility of developing a biological sensor for the quantitative detection of microbial cells.

## СУЛЬФИДОКИСЛЯЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ КОЛЛЕКЦИОННЫХ ШТАММОВ НОКАРДИОПОДОБНЫХ АКТИНОБАКТЕРИЙ

Елькин А. А.<sup>1</sup>, Кылосова Т. И.<sup>2</sup>, Гришко В. В.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН; <sup>2</sup>Пермский государственный национальный исследовательский; <sup>3</sup>Институт технической химии УрО РАН, Пермь, Россия

Изучена способность к биотрансформации фенолметилового сульфида коллекционными штаммами актинобактерий, принадлежащих к родам *Dietzia*, *Gordonia* и *Rhodococcus*. Выявлено, что ни один из десяти исследованных штаммов *D. maris* не способен к окислению фенолметилового сульфида в условиях поставленных экспериментов. При исследовании коллекционных штаммов *G. rubripertincta* (11), *G. terrae* (6), *R. erythropolis* (21), *R. fascians* (13) и 'R. longus' (7) показана их способность к окислению фенолметилового сульфида с образованием (R)-фенолметилового сульфоксида. Штаммы *R. opacus* (9) и *R. rhodochrous* (15) окисляют модельный сульфид с образованием (S)-фенолметилового сульфоксида. В то время как представители *R. ruber* (31) способны к окислению фенолметилового сульфида с образованием соответствующих (R)- и (S)-сульфоксидов. Сделано предположение о том, что интенсивность окисления фенолметилового сульфида, образование фенолметилового сульфоксида и сульфона актинобактериями, по-видимому, носит штаммоспецифичный характер.

**Ключевые слова:** актинобактерии, биокатализ, тиоанизол, (R)- и (S)-фенолметилсульфоксиды.

**Актуальность и цель работы.** В асимметрическом синтезе и при получении биологически активных соединений в качестве строительных блоков и стереонаправляющих групп активно используются оптически чистые сульфоксиды [1,2]. При получении оптически активных сульфоксидов из прохиральных сульфидов с помощью биокаталитических методов синтеза все чаще используются представители технологически перспективной группы актинобактерий. При этом единичные публикации, касающиеся стереоселективного окисления сульфидов актинобактериями, описывают биокаталитические свойства конкретного штамма, зачастую не идентифицированного до вида [3,4]. На основании имеющихся сведений невозможно обоснованно определить, какие из аспектов окисления прохиральных сульфидов носят штаммоспецифичный характер, а какие распространяются на вид в целом.

**Цель работы** – сравнительное исследование способности коллекционных штаммов актинобактерий к окислительной биотрансформации арилалкилсульфидов.

**Материалы и методы.** Рабочая коллекция включала 123 штамма, принадлежащие к *Dietzia maris* (10), *Gordonia rubripertincta* (11), *G. terrae* (6), *Rhodococcus erythropolis* (21), *R. fascians* (13), 'R. longus' (7), *R. opacus* (9), *R. rhodochrous* (15) и *R. ruber* (31) и поддерживаемые в Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов (акроним ИЭГМ, номер во Всемирной федерации коллекций культур #768, [www.iegм.ru/iegмcol](http://www.iegм.ru/iegмcol)).

В качестве модельного сульфида использовали фенолметильный сульфид (ФМС) (Sigma-Aldrich, 99%). Культуры выращивали в пластиковых пробирках объемом 50 мл, в которые вносили 20 мл минеральной среды следующего состава г/л: KNO<sub>3</sub> – 1,0; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 1,0; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 1,0; NaCl – 1,0; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O – 0,2; CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O – 0,02; FeCl<sub>3</sub> – 0,001; с добавлением 0,1% дрожжевого экстракта, 0,1 об.% растворка микроэлементов по Постгейту, 0,1 об.% *n*-гексадекана. Культивирование проводили на орбитальной качалке Certomat IS (Sartorius, Германия) (160 об/мин, 28°C). В качестве посевого материала использовали клетки акти-

нобактерий ( $5,0 \pm 0,7 \times 10^6$  клеток/мл), выращенные на мясопептонном агаре и отобранные в экспоненциальной фазе роста. ФМС (0,5 г/л) в питательную среду добавляли в виде раствора в изопропанол (1:10 v/v) через 2 сут после начала инкубации бактериальных клеток. Продолжительность процесса биотрансформации ФМС составляла 5 сут.

Продукты биотрансформации ФМС экстрагировали с помощью этилацетата. Образование продуктов биотрансформации контролировали методом ТСХ при сравнении с эталонными образцами ФМС, фенилметилового сульфоксида (ФМСО) и сульфона. Качественный и количественный анализ продуктов биотрансформации осуществляли методом хромато-масс-спектрометрии с помощью газового хроматографа 6890N (Agilent, США). Оптическое вращение  $[\alpha_D]$  (S)-ФМСО в хлороформе, полученного с использованием клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 66, измеряли на поляриметре модели 341 (Perkin-Elmer, США) при длине волны 589 нм. Конфигурацию асимметрического центра ФМСО подтверждали путем сравнения экспериментальных значений  $[\alpha_D]$  с литературными данными [5]. Определение времени удержания (R)- и (S)-сульфоксидов (13,9 и 15,1 мин соответственно) осуществляли методом хиральной ВЭЖХ с помощью хроматографа LC Prominence (Shimadzu, Япония), оборудованного хиральной колонкой (Knauer, Германия).

**Результаты.** В результате исследования биотрансформирующей активности коллекционных штаммов *Gordonia*, *Dietzia* и *Rhodococcus* в отношении ФМС установлено, что в присутствии *n*-гексадекана представители вида *D. maris* не способны к окислению сульфидов. При этом не выявлены какие-либо родовые или видоспецифичные признаки в проявлении сульфидокисляющей активности гордониями или родококками: уровень образования ФМСО или продукта его более глубокого окисления – сульфона не зависел от систематической принадлежности штамма.

При исследовании стереоселективных особенностей процесса окисления ФМС выявлены определенные закономерности. Так, представители *G. rubripertincta* осуществляли 26-75% биоконверсию ФМС в (R)-ФМСО с *ee* 17-85%. *G. terrae* трансформировали от 53 до 99% ФМС в (R)-ФМСО с *ee* 51-93%. При этом образование сульфона представителями рода *Gordonia* не превышало 10%.

Штаммы вида *R. erythropolis* окисляли 43-90% ФМС в (R)-ФМСО с *ee* 60-99%. Штаммы, синтезирующие ФМСО с энантиомерным избытком более 90%, характеризовались низким уровнем биоконверсии исходного ФМС (43-64%) или высоким уровнем образования сульфона (17-35%).

Коллекционные штаммы *R. fascians* и '*R. longus*' образовывали (R)-ФМСО с *ee* в диапазоне от 50 до 75%. Биоконверсия ФМС не превышала 80%, а уровень образующегося ФМСН (не более 35%) напрямую зависел от степени биоконверсии исходного сульфида: чем выше степень окисления ФМС, тем выше уровень образования сульфона.

Культуры *R. opacus* и *R. rhodochrous* в отличие от других представителей актинобактерий при окислении ФМС катализировали селективное образование от 51 до 99% энантиокомплементарного (S)-ФМСО (*ee* 6-99%). Образование (S)-ФМСО с низким энантиомерным избытком зарегистрировано у штаммов *R. opacus* ИЭГМ 246 (*ee* 38%), *R. opacus* ИЭГМ 768 (*ee* 52%) и *R. rhodochrous* ИЭГМ 633 (*ee* 7%), для которых также характерны невысокая степень конверсии ФМС (до 55%) и незначительный (не более 3%) уровень образования сульфона.

Особо следует отметить, что среди исследованных коллекционных культур лишь представители *R. ruber* способны в равной степени к образованию (R)-ФМСО (14 штаммов) и (S)-ФМСО (17 штаммов). При этом уровень конверсии ФМС не зависел от конфигурации образующегося сульфоксида и составлял от 32 до 98%. Для большинства исследованных штаммов *R. ruber* уровень энантиоселективности не превышал 75%. При этом *R. ruber* ИЭГМ 339 характеризовался высоким уровнем биоконверсии ФМС (98%) с образованием (R)-ФМСО (*ee* 99%).

Работа поддержана грантом РФФИ № 14-04-96006-р-урал и грантом Президента Российской Федерации для поддержки ведущих научных школ РФ НШ-4607.2014.4.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wojaczyńska E., Wojaczyński J. Chem Rev 2010, 110, 4303-4356.
2. Ludwig G., Kaluderović G. N., Ruffer T., Bette M., Korb M. et al. Dalton Trans 2013, 42, 3771-3774.
3. Zhang J.-D., Li A. T., Yang Y., Xu J. H. Appl Microbiol Biotechnol 2010, 85, 615-624.

4. Li A.-T., Yu H.-L., Pan J., Zhang J.-D., Xu J.-H. et al. *Bioresour Technol* 2011, 102, 1537-1542.
5. Holland H.L., Brown F.M., Kerridge A., Penkos P., Arensdor J. *J Mol Catal B: Enzym* 2003, 22, 219-223.

## SULFOXIDATION ACTIVITY OF ACTINOBACTERIA

Elkin A. A.<sup>1</sup>, Kylosova T. I.<sup>2</sup>, Grishko V. V.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, UB RAS;* <sup>2</sup>*Perm State National Research University;* <sup>3</sup>*Institute of Technical Chemistry, UB RAS, Perm, Russia*

Methyl phenyl sulfide biotransformation ability of *Dietzia*, *Gordonia* and *Rhodococcus* actinobacteria was studied. *D. maris* strains were not capable to oxidize this sulfide. *G. rubripertincta*, *G. terrae*, *R. erythropolis*, *R. fascians* and 'R. longus' transformed sulfide into (R)-methyl phenyl sulfoxide. *R. opacus* and *R. rhodochrous* produced (S)-methyl phenyl sulfoxide. *R. ruber* were able to oxidize methyl phenyl sulfide into both (R)- and (S)-sulfoxides.

---

---

## ИММОБИЛИЗОВАННЫЕ НИТРИЛГИДРОЛИЗУЮЩИЕ БАКТЕРИИ ДЛЯ СИСТЕМ БИОФИЛЬТРАЦИИ

Зорина А. С.<sup>1</sup>, Максимова Ю. Г.<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>*ФГБОУ ВПО Пермский национальный исследовательский политехнический университет;* <sup>2</sup>*Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН;* <sup>3</sup>*ФГБОУ ВПО Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия*

Очистка сточных вод от амидов и нитрилов при помощи иммобилизованных нитрилгидролизующих бактерий может быть альтернативой химическому методу очистки. Изучены свойства углеродных адсорбентов – носителей для иммобилизации бактериальных клеток. Выявлена сильная положительная корреляционная связь между гидрофобностью поверхности клеток и носителя. Показано, что с увеличением размера частиц носителя происходит снижение величины адсорбции клеток, что, в свою очередь, приводит к увеличению их удельной нитрилазной активности. Биопленки *R. ruber* gt1, выращенные на активированном карбопоне, сохраняли более 50% нитрилгидратазной активности на протяжении четырнадцати 20-минутных циклов гидролиза акрилонитрила.

**Ключевые слова:** биофильтр, нитрилгидролизующие бактерии, адсорбент, гидрофобность, каталитическая активность.

**Актуальность и цель работы.** В настоящее время основными системами очистки сточных вод, наряду с функционирующим в аэро- и анаэротенках активным илом, являются биофильтры [1]. Биофильтр – это сооружение, в котором сточная вода фильтруется через загрузочный материал, покрытый образованной микроорганизмами биопленкой. Биопленки на поверхности загрузочного материала формирует микрофлора окружающей среды, либо адсорбент может быть искусственно заселен микроорганизмами с определенными биодеградативными свойствами.

Очистка сточных вод от амидов и нитрилов карбоновых кислот (акриламида, акрилони-трила, ацетонитрила и др.) при помощи нитрилгидролизующих бактерий может являться альтернативой химическому методу [2]. Биокаталитический процесс протекает в более мягких условиях, при физиологических температуре, рН и давлении, в неагрессивных средах, что позволяет упростить технологическую схему.

Иммобилизация бактериальных клеток позволяет перейти к гетерогенному процессу биодеградации, что дает возможность наладить непрерывный и длительный процесс,

снизив при этом прирост биомассы, стабилизировать активность и повысить устойчивость бактерий.

**Цель работы** – определение параметров иммобилизованной системы (величины адсорбции клеток нитрилгидролизующих бактерий, их активности и стабильности) как критериев выбора оптимального адсорбента для биофильтра.

**Материалы и методы.** Штаммы нитрилизующих бактерий *Rhodococcus erythropolis* 11-2, *Rhodococcus ruber* gt1, *Pseudomonas fluorescens* C2, *Acinetobacter* sp. 11h и *Alcaligenes faecalis* 2 выращивали на синтетической минеральной среде. Гидрофобность клеток оценивали по относительному распределению между водной фазой и фазой органического растворителя гексадекана и выражали в процентах клеток, адсорбированных в фазе гексадекана. Гидрофобность носителей оценивали по адсорбции нафталина из 0,1 мМ водного раствора и выражали в процентах.

Адсорбцию клеток выращенной культуры проводили в течение 30 мин при 22°C на активных углях БАУ (пр-во Россия) и Norit PK 1–3 (пр-во Голландия), ФТД (активный уголь на основе фенолформальдегидной смолы), ФАС (активный уголь на основе фуриловой смолы), углеродных адсорбентах Сибуните (на основе графитизированной сажи) и «Сапропеле» (карбонизированный ил пресных озер), а также сферическом углерод-минеральном сорбенте марки СУМС. Биопленки нитрилгидролизующих бактерий выращивали на волокнистых углеродных материалах марок Карбопон, Карбопон-В-актив, Урал ТМ-4 (пр-ва Беларусь) и активном угле БАУ в течение 7 сут.

Трансформацию нитрилов и амидов адгезированными клетками и биопленками проводили в фосфатном буфере (рН 7,2) при температуре 22°C, продукты реакции определяли методом ВЭЖХ.

Для исследования связи двух признаков в случае нормального распределения вычисляли коэффициент корреляции Пирсона ( $r$ ), при этом статистическая достоверность рассчитывалась при уровне значимости  $p=0,05$ . Степень корреляции оценивали в зависимости от значения коэффициента  $|r|<0,3$  – слабая,  $0,3<|r|<0,7$  – умеренная корреляция,  $|r|>0,7$  – сильная корреляция.

**Результаты.** Гидрофобность поверхности клеток изученных штаммов, оцененная

по сродству к *n*-гексадекану, составила 5,9% для *P. fluorescens* C2, 4,8% для *Acinetobacter* sp. 11h, 18,5% для *A. faecalis* 2, 41,1 и 47,5% для *R. erythropolis* 11-2 и *R. ruber* gt1 соответственно. Исходя из полученных данных, клеточная стенка *P. fluorescens* C2 и *Acinetobacter* sp. 11h была определена как гидрофильная, *R. erythropolis* 11-2 и *R. ruber* gt1 – гидрофобная, *A. faecalis* 2 – имеющая промежуточное значение гидрофобности.

Определена величина адсорбции бактериальных клеток на носителях с разной величиной гидрофобности. Для штамма *P. fluorescens* C2 отмечали умеренную отрицательную связь между величиной адсорбции и гидрофобностью носителей ( $r=-0,664$ ;  $p=0,05$ ), что может быть объяснено тем, что все носители в той или иной мере были гидрофобны (от 20 до 92%). Наибольшая величина адсорбции клеток этого штамма (11,55 мг клеток/г носителя) была отмечена на носителе марки «Сапропель», гидрофобность которого составляла 20,8%. При оценке зависимости от гидрофобности клеточной стенки величины адсорбции клеток на углеродсодержащих носителях была выявлена сильная положительная связь от  $r=0,884$  до  $r=0,950$  ( $p=0,05$ ). Следовательно, при адсорбции на гидрофобном носителе величина адсорбции клеток тем выше, чем больше гидрофобность поверхности клеток. Максимальные показатели величины адсорбции клеток на всех изученных носителях наблюдались у наиболее гидрофобных родококков, причем наибольшие значения были отмечены при адсорбции *R. erythropolis* 11-2 на Сибуните и «Сапропеле» – 36,5 и 37,3 мг/г соответственно.

Изучено изменение нитрилизующей активности иммобилизованных клеток в зависимости от дисперсности носителя. Показано, что с увеличением размера частиц носителя происходит снижение адсорбции клеток, что, в свою очередь, приводит к увеличению удельной активности клеток. Так, при иммобилизации клеток *P. fluorescens* C2 на угле-сырце с размером фракций 0,05-0,4, 1-6 и 3-10 мм величина адсорбции составила 2,07, 0,15 и 0,03 мг/г соответственно, а величина удельной активности клеток – 20,8, 150,3 и 727,6 ммоль карбоновой кислоты/ (г·ч) соответственно.

Оценили операционную стабильность выращенных на разных носителях (Урал ТМ-4, БАУ, Карбопон-В-актив, Карбопон не активированный) биопленок *R. ruber* gt1 по сохра-

нению нитрилгидратазной активности при проведении последовательных 20-минутных циклов биотрансформации акрилонитрила. Биопленки, выращенные на активированном Карбопоне, сохраняли более 50% активности на протяжении четырнадцати 20-минутных циклов гидролиза акрилонитрила.

По результатам данной работы в качестве наполнителя биофильтра для очистки сточных вод от нитрильных и амидных соединений предлагается использовать иммобилизованные на крупнодисперсных сорбентах клетки штаммов нитрилгидролизующих бактерий, совпадающие по степени гидрофобно-

сти клеточной стенки с носителем, или биопленки, выращенные на Карбопон-В-актив, так как данные биокатализаторы отличаются от остальных высокой удельной активностью и ее сохранением в течение продолжительного времени.

Работа поддержана программой УМНИК (2014 г), г. Пермь.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Плакунов В. К., Николаев Ю. А. Вода: химия и экология 2008, 2, 1–13.
2. Демаков В. А., Максимова Ю. Г., Максимов А. Ю. Биотехнология 2008, 2, 30–45.

### NITRILE HYDROLYZING IMMOBILIZED BACTERIA FOR BIOFILTRATION SYSTEMS

Zorina A. S.<sup>1</sup>, Maksimova Yu. G.<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Perm National Research Polytechnic University; <sup>2</sup>Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms UB RAS; <sup>3</sup>Perm State National Research University, Perm, Russia

Treatment of wastewater from amides and nitriles using nitrile hydrolyzing immobilized bacteria can be used as an alternative to chemical methods. Properties of carbon adsorbents being carriers for immobilization of bacterial cells were studied. A strong positive correlation between the hydrophobicity of the surface of cells and carrier was found. It has been shown that while increasing the size of the carrier particles, decreasing of adsorption level of cells occurs, which in turn leads to an increase of their specific nitrilase activity. Biofilms of *R. ruber* gt1, hydroponically grown on activated CarboPon retained more than 50% of the nitrile hydratase activity for fourteen 20 min cycles of acrylonitrile hydrolysis.

---

### ВЛИЯНИЕ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ *CLOSTRIDIUM HISTOLYTICUM* ШТАММ 468 – ПРОДУЦЕНТА КОЛЛАГЕНАЗЫ

Конон А. Д., Петровский С. В., Титова Т. Г., Шамбурова М. Ю., Уварова А. В., Козлова Ю. О.

ФГУП «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт вакцин и сывороток и предприятие по производству бактериальных препаратов» ФМБА, Санкт-Петербург, Россия

Исследовали синтез коллагенолитических и побочных протеаз *Clostridium histolyticum* штамм 468 в средах на основе растительных пептонов в качестве альтернативы субстратам, содержащих компоненты животного происхождения. Показано, что в таких условиях культивирования коллагеназная активность фильтратов культуральной жидкости штамма 468 была на 30–80% выше, чем в образцах, полученных на традиционном субстрате. Протеазная активность и активность клострипаина (побочные протеазы) составляли 45–60 Кл/мл и 1,5–2,0 ПЕ/мл соответственно не зависимо от природы основного источника углерода. Полученные результаты могут быть основой для усовершенствования технологии микробных коллагеназ.

**Ключевые слова:** коллагеназа, *Clostridium histolyticum* штамм 458, питательная среда, растительный пептон.

**Актуальность и цель работы.** На протяжении многих лет протеолитический фермент коллагеназа – эндопептидаза привлекает внимание ученых всего мира своей способностью гидролизовать тройную спираль молекулы нерастворимого природного белка коллагена. Коллагеназа используется в косметологии и медицине для профилактики и лечения рубцовых образований, в том числе контрактуры Дюпюитрена (заболевание кисти, связанное с рубцовым перерождением и укорачиванием ладонных сухожилий), а также в диагностических и лабораторных целях, например, для дезинтеграции тканей *in vitro* [1, 2].

Источниками коллагеназы могут быть ткани млекопитающих, ракообразных (крабы, креветки), насекомых, а также культуры микроорганизмов (грибы, бактерии), в том числе и рекомбинантные [3]. Основным преимуществом бактериальных коллагеназ перед эукариотическими является их свойство расщеплять нативный коллаген [3].

На предприятии ФГУП СПбНИИВС ФМБА производится препарат Коллализин®, основным действующим веществом которого является коллагеназа, полученная из культуральной жидкости после выращивания *Clostridium histolyticum* штамм 458 в среде с животными компонентами (среда Рамона). Однако, разработки последних лет [4, 5] направлены на поиск альтернативных питательных сред для культивирования *Clostridium histolyticum*, не содержащих компонентов животного происхождения. Их использование позволит снизить синтез побочного протеолитического фермента клострипаина, вызывающего деструкцию коллагеназы, а также облегчить последующую очистку целевого продукта [4, 5].

**Целью** нашей работы было исследование возможности замены компонентов животного происхождения в составе питательной среды для культивирования *C. histolyticum* штамм 468 на растительные.

**Материалы и методы.** Культивирование *C. histolyticum* штамм 468 проводили в традиционной среде Рамона с животными компонентами и в альтернативных средах следующего состава: среда 1, г/л: соевый пептон – 15, гороховый пептон – 15, желатин из кожи рыб – 50, CaCl<sub>2</sub> – 0,111, pH 7,2 [4]; среда 2, г/л: соевый пептон – 103, дрожжевой экстракт – 17, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 1,92, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 1,25, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 3,5, NaCl – 2,5, MgSO<sub>4</sub> – 0,072, FeSO<sub>4</sub> – 0,011, pH 7,4 [5]. По-

севной материал вносили 10% (по объему) в виде суточной культуры микроорганизмов штамма 468. Культивирование *C. histolyticum* штамм 468 проводили в стационарных условиях без доступа кислорода в колбах вместимостью 750 мл при 37 °С в течении 44-67 ч.

Микробную массу от культуральной жидкости отделяли фильтрацией на глубинных фильтрах или центрифугированием, полученный раствор коллагеназы стерилизовали через фильтры с порами 0,2 мкм. Фермент из фильтрата осаждали сульфатом аммония, полученный флотат/осадок растворяли в солевом буфере (pH 8,0). На всех этапах получения культуральной жидкости и очистки коллагеназы контролировали содержание белка по методу Бредфорд, коллагеназную активность колориметрическим методом с нингидрином, протеазную активность спектрометрическим методом по тирозину и активность клострипаина спектрометрическим методом с ВАЕЕ.

**Результаты.** Показано, что среда 1 и среда 2 могут быть использованы для культивирования *C. histolyticum* штамм 468 с целью получения коллагеназы, при этом коллагеназная активность фильтратов была выше в 1,3-1,8 раз по сравнению с полученными показателями в среде с животными компонентами. Удельная коллагеназная активность образцов практически не отличалась и была на уровне 1500-2000 КЕ/мг белка, тогда как активность клострипаина после выращивания продуцента в среде 2 была на порядок выше (300 Кл/мл), чем в среде 1 и среде с животными компонентами (45-60 Кл/мл). Кроме того, фильтрат коллагеназы после культивирования микроорганизмов штамма 468 в среде 2 содержал высокую концентрацию пигмента, что значительно усложняло дальнейшую очистку хроматографическим методом. Поэтому на следующем этапе концентрацию растительного пептона и дрожжевого экстракта в среде 2 снизили в 3,25 раза до уровня соответствующего количеству аминного азота в среде Рамона. Показано, что в таких условиях культивирования удельная коллагеназная активность снизилась не более чем на 25%, тогда как активность клострипаина – в 4,7 раза.

Во всех вариантах фильтрата культуральной жидкости микроорганизмов штамма 458 протеазная активность была на уровне 1,5-2,0 ПЕ/мл, кроме образца, полученного в сре-



де 2, в котором активность протеолитических ферментов составляла 0,1 ПЕ/мл.

Коллагеназу из фильтратов осаждали сульфатом аммония, полученный флотат/осадок растворяли в буфере и определяли концентрацию белка и коллагеназную активность растворов фермента. Показано, что выход по белку и коллагеназной активности образцов растворенного осадка, полученного из культуральной жидкости в среде 1 и модифицированной среде 2 (более низкое содержание растительного пептона и дрожжевого экстракта), был на 10-25% выше показателей в среде Рамона. После выделения фермента из фильтрата *C. histolyticum* штамм 468 (культивирование в среде 2) выход по белку был на уровне контроля (среда Рамона), тогда как выход по коллагеназной активности снижался в 2 раза, что может быть связано с излишним содержанием аминов в питательной среде, приводящим к накоплению неспецифического белка.

Таким образом, в результате проведенных исследований показана принципиальная воз-

можность замены компонентов животного происхождения на растительные пептоны в среде для культивирования *C. histolyticum* штамм 468 с целью получения коллагеназы. Результаты могут стать основой для разработки новой технологии получения коллагеназы *C. histolyticum* штамм 468 в среде с растительным пептоном.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Duarte A. S., Correia A., Esteves A. C. Crit Rev Microbiol 2014, 22, 1–21
2. Schulze S. M., Tursi J. P. Hand (NY) 2014, 9 (4), 447-458.
3. Руденская Г. Н., Можина Н. В. Биомедицинская химия 2004, 6, 539-553.
4. Suppmann B., Hoelke W., Hoffmann A., Marx T., Sonn K., Thalhofer J. – P. Pat. US 8,236,356 B2 Growth medium for Clostridium histolyticum – Appl. № US 12/478,306; 04 Jun. 2009 published 7 Aug. 2012, 24 p.
5. Wegman T. L., Yu B. Pat. US 2012/0237497 A1 Compositions and methods for producing clostridial collagenases – Appl. № US 13/422,939; 16 Mar. 2012; published 20 Sept. 2012, 12 p.

### INFLUENCE MEDIUM DURING CULTIVATION *CLOSTRIDIUM HISTILYTICUM* STRAIN 468 – PRODUCER OF COLLAGENASE

Konon A. D., Petrovsky S. V., Titova T. G., Shamburova M. Y.,  
Uvarova A. V., Kozlova J. O.

FSUE "St. Petersburg Scientific Research Institute for Vaccines and Serums and enterprise  
for the production of bacterial drugs" FMBA, St. Petersburg, Russia

The synthesis of collagenolytic and other contaminating proteases by *Clostridium histolyticum* strain 468 in medium based on vegetable peptones as an alternative substrate for meat-derived ingredients was investigated. It was shown that under these conditions the collagenase activity of culture filtrates of strain 468 was by 30-80% higher than in samples obtained on traditional substrate. Protease activity and activity of clostripain (contaminating proteases) were 45-60 PE/ml and 1.5-2.0 Cl/ml, respectively, regardless of the nature of the main carbon source. The results can be the basis for the improvement of technology microbial collagenases.

## РАЗРАБОТКА ПРОТИВОВИРУСНЫХ ВАКЦИН НА ОСНОВЕ ЛЕНТИВИРУСОВ, КАПСУЛИРОВАННЫХ В ХИТОЗАН

Зубарева А. А.<sup>1</sup>, Зубков Д. А.<sup>2</sup>, Рязанцев Д. Ю.<sup>2</sup>,  
Димитриева Т. В.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ФГБУН Центр «Биоинженерия» РАН; <sup>2</sup>ФГБУН Институт  
биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина  
и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

Для терапии вирусных инфекций эффективной является вакцинация больных аттенуированными вакцинами. Синтетические вакцины значительно менее эффективны, что связано с транспортировкой вакцин в эндосомальный путь процессинга антиген-презентирующих клеток. Индукция цитотоксических лимфоцитов эффективна при процессинге антигена через цитозольный путь, для чего требуется доставка антигена внутрь клеток, минуя эндосомальный путь. В данной работе получен комплекс непатогенных лентивирусов, кодирующих GFP, с гексаноил-хитозаном, конъюгированным с рекомбинантным белком E2 вируса Эпштейн-Барра. Инкубация макрофагов RAW267.2 со свободным гексаноил-хитозаном приводила к транспортировке хитозана в митохондрии и лизосомы, а с комплексом лентивирусов с гексаноил-хитозаном – в цитоплазму клеток, что является достаточным для процессинга белка ЭБВ через цитозольный путь.

*Ключевые слова:* лентивирусы, хитозан, Эпштейн-Барр, клеточный ответ, противовирусные вакцины.

**Актуальность и цель работы.** Для терапии вирусных инфекций эффективной является вакцинация больных. Наиболее эффективны вакцины, включающие аттенуированные вирусы. Синтетические вакцины значительно менее эффективны, что связано с транспортировкой вакцин в эндосомальный путь процессинга антиген-презентирующих клеток. Индукция цитотоксических лимфоцитов эффективна при процессинге антигена через цитозольный путь, для чего требуется доставка антигена внутрь клеток, минуя эндосомальный путь [1]. Один из способов доставки вирусных антигенов в цитозольный путь может быть основан на включении в состав синтетических вакцин непатогенных вирусов. Однако в состав такой вакцины требуется ввести вирусные антигены.

**Целью** данной работы является разработка структуры прототипа вакцины для терапии Эпштейн-Барр герпетической вирусной инфекции (ЭБВ) на основе непатогенных лентивирусов, капсулированных в хитозан и несущих фрагменты белка E2 ЭБВ. В настоящий

момент 80–90% людей являются носителями ЭБВ, что показывает актуальность разработки вакцин для профилактики герпетической инфекции [2]. Хитозан является биodeградируемым и биосовместимым природным полимером, получаемым из хитина [3]. Особенностью хитозана является наличие многочисленных реакционных групп, которые можно использовать как для иммобилизации белков, так и для получения производных хитозана с разными свойствами.

**Материалы и методы.** В работе использовали лентивирусы, содержащие зеленый флуоресцентный белок GFP, переклонированный в вектор pLV-neo из плазмиды pEGFPN1. Лентивирусы нарабатывали в клетках HEK-293T. Для этого клетки трансфецировали плазмидами-паковщиками CMV и VSV и целевой плазмидой pLV-neo-GFP. Отбирали супернатанты трансфецированных клеток, содержащие лентивирусы, которые концентрировали ультрафильтрацией на мембране с отсечкой 100 кДа (Millipore) и использовали для экспериментов. Фрагмент белка E2 ЭБВ

клонировали с помощью перекрывающихся праймеров. Синтетический ген клонировали в бактериях *Escherichia coli*. Белок выделяли на Ni-агарозе. Хитозан разной молекулярной массы (ММ), получали щелочным гидролизом из хитозана ММ 300 кДа (ЗАО Биопрогресс). Из хитозана синтезировали производные с гидрофобными группами, а также с сукцинилными группами для получения хитозана с разными свойствами. Для всех производных были получены флуоресцентно меченые аналоги. Белок ЭБВ конъюгировали с хитозаном карбодиимидным методом. Комплекс лентивирусов с хитозаном формировали методом полиэлектролитного комплексообразования. Размер и заряд лентивирусов и комплексов хитозан-лентивирусы оценивали методом динамического светорассеяния. Формирование комплекса оценивали методом конфокальной микроскопии. Инфицирование клеток комплексами и свободными вирусами оценивали на линии макрофагов мыши RAW267.2.

**Результаты.** Для разработки комплекса с лентивирусами получили панель хитозанов с разными свойствами: ММ 50, 200 и 340 кДа; гидрофобизованные производные гексаноил-хитозан (ГХ) (ММ 200 кДа) и додецилхитозан (ММ 50 кДа); производная с отрицательным зарядом сукциноилхитозан (ММ 340 кДа), гидрофобизованная произво-

дная с отрицательным зарядом додецилсукциноил-хитозан (ММ 50 кДа). Для всех полученных хитозанов получали флуоресцентно меченые производные для визуализации формирования комплексов. В первой серии экспериментов подбирали условия формирования комплексов. Показали, что гидрофобизованный ГХ лучше всего капсулировал лентивирусы. Для дальнейшей работы получали конъюгат белка E2 ЭБВ с ГХ. Связывание анализировали методом гель-электрофореза и спектрофотометрически. Полученный конъюгат использовали для формирования комплексов с лентивирусами. Показали формирование комплексов методами интерференционной и конфокальной микроскопии. Анализ прохождения вирусов в клетки проводили на культуре клеток макрофагов мыши RAW267.2. Показали, что свободный хитозан попадает в лизосомы и митохондрии клеток, а комплексы в значительном количестве попадают в цитозоль, что требуется для процесса антигена через путь МНС I класса.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Comber J.D., Philip R. Ther Adv Vaccines 2014, 2 (3), 77-89.
2. Wang Z., Yang S., Zhou L. et al. Sci China Life Sci 2011, 54 (3), 263-266.
3. Highton A.J., Kojarunchitt T., Girardin A. et al. Immunol Cell Biol 2015, doi: 10.1038/icb.2015.14.

### DEVELOPMENT OF ANTIVIRAL VACCINES BASED ON LENTIVIRUSES CAPSULATED IN CHITOSAN

Zubareva A. A.<sup>1</sup>, Zubkov D. A.<sup>2</sup>, Ryazantsev D. Yu.<sup>2</sup>,  
Dimitrieva T. V.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Centre "Bioengineering", RAS; <sup>2</sup>M.M. Shemyakin and Yu.A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, RAS, Moscow, Russia

Vaccination by attenuated vaccines is efficient in the protection against viral infections. However synthetic vaccines are much less efficient as a result of endosomal processing by antigen-processing cells of exogenous antigens. Cytosolic processing of antigens is required to induce cytotoxic lymphocytes. The aim of this work was to develop a complex between nonpathogenic lentiviruses and hexanoyl-chitosan conjugated to recombinant Epstein-Barr virus E2 protein. Incubation of macrophages RAW267.2 with hexanoyl-chitosan led to its traffic to mitochondria and lysosomes while lentiviruses-hexanoyl-chitosan complexes penetrated the cells and were found in cytoplasm which is sufficient for cytosolic processing of Epstein-Barr virus E2 protein.

## ПОВЕРХНОСТНАЯ УЛЬТРАСТРУКТУРА И НАНОМЕХАНИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА РОДОКОККОВ С РАЗНОЙ АДГЕЗИВНОЙ АКТИВНОСТЬЮ

Криворучко А. В.<sup>1,2</sup>, Коршунова И. О.<sup>2</sup>, Лунегова И. С.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Пермский государственный национальный исследовательский университет;

<sup>2</sup>Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь, Россия

С помощью метода атомно-силовой микроскопии исследовано влияние поверхностной ультраструктуры и наномеханических свойств родококков на их адгезивную активность в отношении твердой поверхности. Показано, что адгезионная способность родококков зависит ( $R = 0,9$ ,  $p = 0,00$ ) от степени шероховатости клеточной стенки. Установлено, что клеточные выступы родококков высотой от 99 до 223 нм характеризуются низкими ( $\leq 0,9$  нН) значениями силы адгезии кантилевера по сравнению с остальной частью клеточной поверхности, что свидетельствует о локализации в них адгезинов.

**Ключевые слова:** актинобактерии рода *Rhodococcus*, бактериальная адгезия, клеточные выступы, атомно-силовая микроскопия.

**Актуальность и цель работы.** Актинобактерии рода *Rhodococcus* – перспективная группа промышленных микроорганизмов. Родококки обладают уникальным комплексом клеточных приспособлений, позволяющим им метаболизировать широкий спектр гидрофобных органических соединений. Эти приспособления выражаются в присутствии в клеточной стенке миколовых кислот, увеличивающих гидрофобность клеточной поверхности, образовании одиночных пилевидных поверхностных тяжей и множественных шишковидных выростов на наружной поверхности клеточной стенки, способствующих увеличению площади контакта клетки и гидрофобного субстрата, синтезе поверхностно-активных веществ гликолипидной природы [1]. С перечисленными приспособлениями, по-видимому, связана также способность родококков к адгезии, колонизации твердых поверхностей и агрегации. Однако роль этих приспособлений в процессах самоиммобилизации родококков отдельно не исследовалась.

**Цель** настоящей работы – исследование влияния поверхностной ультраструктуры и наномеханических свойств родококков на их адгезивную активность в отношении твердой поверхности.

**Материалы и методы.** В работе использовали 65 штаммов родококков, относящихся к *Rhodococcus erythropolis* (15), *R. fascians* (4), '*R. longus*' (9), *R. opacus* (9), *R. rhodochrous* (6),

*R. ruber* (22) из Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов (официальный акроним коллекции ИЭГМ, номер во Всемирной федерации коллекций культур 768, [www.iegм.ru/iegмcol](http://www.iegм.ru/iegмcol)). Родококки выращивали в мясопептонном бульоне в условиях перемешивания (160 об/мин) при 28 °С в течение 28-30 ч до достижения поздней экспоненциальной фазы роста. Клетки отмывали от питательной среды и ресуспендировали в 0,5% NaCl в концентрации, соответствующей оптической плотности (ОП<sub>600</sub> нм) суспензии 1,0. Адгезивную активность родококков определяли экспрессным методом с использованием 96-луночных полистирольных микропланшетов ("Медполимер", Санкт-Петербург) по окрашиванию прикрепленных клеток кристаллическим фиолетовым [2]. Ультраструктурные особенности клеточной поверхности и наномеханические свойства клеток изучали с помощью атомно-силового микроскопа MFP-3D-BIO ("Asylum Research", США). Для АСМ бактериальные клетки закрепляли на поверхности покровных стекол, предварительно обработанных 0,2% полилизинном ("Sigma"). Микропрепараты сушили на воздухе в течение 30 мин и затем выдерживали 2 сут при 100% влажности, которую создавали в эксикаторе с помощью насыщенного раствора KNO<sub>3</sub> [3]. Сканирование проводили в водной среде в режиме постоянного контакта зонда кантилевера

с образцом. Использовали кремнийнитридные кантилеверы TR400PB (“Olympus Corporation”, Япония) с константой жесткости 0,09 Н/м, радиусом кривизны иглы 42 нм и резонансной частотой 32 кГц. На каждом микропрепарате сканировали не менее 10 клеток. Результаты АСМ-сканирования обрабатывали с помощью программного обеспечения IgorPro 6.22A (“WaveMetrics”, США). Все эксперименты проводили в 3-х-8-микратной повторности.

**Результаты и обсуждение.** Исследуемые штаммы родококков характеризовались различной (от 6 до 68%) адгезивной активностью в отношении модельного твердого носителя (полистирола). Показатели адгезии статистически достоверно ( $R_{\text{Пирсона}} = 0,9$ ,  $p = 0,00$ ) зависели от степени шероховатости клеточной стенки. При этом адгезионная способность родококков с высокой ( $R_t = 140\text{--}223$  нм) степенью шероховатости клеток в 3–11 раз превышала таковую штаммов с гладкой ( $R_t = 25\text{--}79$  нм) клеточной поверхностью. Это согласуется с литературными данными, согласно которым клетки с развитой поверхностью имеют множественные клеточные выступы, которые содержат адгезины, характеризуются низким уровнем поверхностной энергии, повышенной степенью гидрофобности и легко преодолевают энергетический барьер при сближении с носителем [4].

Выступы наружной поверхности клеточной стенки родококков высотой от 99 до 223 нм обладали особыми упруго-механическими свойствами. Сила адгезии зонда кантилевера к этим участкам не превышала 0,9 нН по сравнению с основной частью клеточной стенки, для которой данный показатель варьировал в диапазоне от 1,1 до 3,7 нН. Известно, что сила адгезии прямо пропорционально связана со свободной поверхностной энергией. Чем меньше уровень свободной поверхностной

энергии, тем меньше энергетических затрат требуется для адгезионного процесса [4]. Выявленная тенденция была наиболее ярко выражена у штаммов с высокой (47–68%) адгезивной активностью в отношении полистирола. Это свидетельствует о том, что в выступах клеточной стенки родококков локализуются адгезины, которые могут быть представлены свободными жирными кислотами, гликолипидными биосурфактантами, белками, экзополисахаридами, тейхоевыми кислотами [1, 5]. У родококков с низкой (6–18%) адгезивной активностью клеточные выступы характеризовались повышенными в 2–15 раз значениями модуля упругости по сравнению с остальной частью клеточной стенки. По-видимому, вещества, локализованные в этих выступах, препятствовали адгезионному взаимодействию и выполняли функцию “антиадгезинов”.

В дальнейших исследованиях требуется определение химической природы соединений, локализованных в выступах клеточной стенки родококков. Полученные сведения позволят глубже понять механизмы адгезии данной группы актинобактерий и могут быть использованы при разработке гетерогенных биокатализаторов на их основе.

Работа поддержана грантом РФФИ 14–04–96013–р\_урал\_a.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kuyukina M. S., Ivshina I. B. In: *Biology of Rhodococcus*. H. M. Alvarez (ed.), Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2010, 231–262.
2. Huber B., Riedel K., Hentzer M. *et al.* *Microbiology* 2001, 147, 2517–2528.
3. Васильченко А. С. Дисс. ... канд. 2012, 123 с.
4. Hori K., Matsumoto S. *Biochem Eng J* 2010, 48, 424–434.
5. Bos R., van der Mei H. C., Busscher H. J. *FEMS Microbiol Rev* 1999, 23, 179–230.

### CELL SURFACE ULTRASTRUCTURE AND NANOMECHANICAL PROPERTIES OF RHODOCOCCLUS ACTINOBACTERIA WITH VARIOUS ADHESIVE ACTIVITIES

Krivoruchko A. V.<sup>1,2</sup>, Korshunova I. O.<sup>2</sup>, Lunegova I. S.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Perm State University; <sup>2</sup>Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Perm, Russia

Cell surface ultrastructure and nanomechanical properties of *Rhodococcus* actinobacteria with various adhesive activities towards polystyrene were studied using atomic-force microscopy. It was shown that *Rhodococcus* cell adhesion depended ( $R = 0.9$ ,  $p = 0.00$ ) on cell surface roughness. Cell appendages with a height from 99 to 223 nm were revealed to have low ( $\leq 0.9$  nN) cantilever adhesion forces in comparison with other parts of a cell wall that indicated localization of putative adhesins in these appendages.

## СОДЕРЖАНИЕ ЛИПИДОВ В КЛЕТКАХ МИКРОВОДОРОСЛИ *TETRASELMIS VIRIDIS* ROUCH В ПЛОТНОСТАТНОМ РЕЖИМЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

Новикова Т. М.<sup>1</sup>, Тренкеншу Р. П.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО Севастопольский государственный университет;

<sup>2</sup>ФГБУН Институт морских биологических исследований им. А. О. Ковалевского РАН,  
Севастополь, Россия

В работе исследовано влияние режима непрерывного культивирования на содержание общих липидов, а также удельной скорости роста и продуктивности культуры зеленой микроводоросли *T. viridis*. Экспериментально показано, что режим плотностата позволяет получать высокую продуктивность и содержание общих липидов в культуре *T. viridis*.

**Ключевые слова:** микроводоросль *Tetraselmis viridis*, липиды, плотностат.

**Актуальность и цель работы.** Микроводоросли на сегодняшний день все чаще используются в медицине, косметологии, аквакультуре, животноводстве и т.д. Однако, видов микроводорослей, перспективных в качестве источников полезных соединений, таких как альфа-линоленовая кислота (АЛК), эйкозапентаеновая кислота (ЭПК), докозапентаеновая кислота (ДПК) и др., исследовано мало. Интерес к роду *Tetraselmis* связан со способностью некоторых видов, накапливать относительно большое количество полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК), причем содержание их зависит от условий и способов культивирования.

В предлагаемой работе представлены результаты изучения зависимости содержания липидов в культуре микроводоросли *T. viridis* от плотности культуры при непрерывном выращивании.

**Материалы и методы.** В эксперименте использовалась альгологически чистая культура зеленой жгутиковой микроводоросли *Tetraselmis viridis* Rouch (syn. *Platymonas viridis*) штамм IBSS-25 из коллекции ИМБИ РАН.

Водоросль *T. viridis* методом квазинепрерывных культур [1] выращивалась на питательной среде Тренкеншу [2]. Такой режим выращивания обеспечивал рост микроводоросли лимитированный только световыми условиями. Для приготовления среды использовали пастеризованную морскую воду.

Культура, взятая из коллекции, была предварительно адаптирована к экспериментальным условиям. *T. viridis* выращивали в стеклянных культиваторах плоскопараллельного типа, с глубиной освещаемого слоя 5 см и объемом – 3000 мл. Этот объем поддерживали на протяжении всего эксперимента, доливая перед измерениями дистиллированную воду до отметки 3 л. Культиватор освещали сбоку лампами GE F18W/54-765, которые давали среднюю поверхностную освещенность для фотореактора 19 кЛк. Температуру стабилизировали на уровне 28–30 °С. В процессе выращивания культуру непрерывно барботировали с помощью компрессорной установки газо-воздушной смесью с 3% по объему углекислого газа.

Оптическую плотность при длине волны 750 нм использовали как косвенный показатель биомассы водорослей. Измерения проводили с помощью фотоэлектроколориметра КФК-2 в кювете 0,5 см. Переход от единиц оптической плотности (D750) к величине сухой массы (СВ – биомасса высушена при 105°С) осуществляли посредством эмпирического коэффициента  $k$ , равного 0,8 г·л<sup>-1</sup> ед.опт.пл<sup>-1</sup>; СВ =  $k \times D750$ . Пересчет величин сухого к органическому веществу осуществляли с учетом зольности культуры *T. viridis*, которая составила 21%.

Плотностатный режим культивирования обеспечивался ежесуточным сливом части

суспензии микроводоросли и долива свежей питательной среды до нижнего уровня плотности культуры ( $B_0$ ), который задавался величиной от 0,4 до 1 г·л<sup>-1</sup> с шагом 0,1 г·л<sup>-1</sup>. Для каждой стационарной плотности культуру держали в заданном режиме 7 дней. После того, как культура была адаптирована к каждой из плотностей, в течение трех суток проводился отбор проб для определения липидов. Общие липиды определяли методом с фосфованилиновым реактивом.

**Результаты.** Нами разработана модель управления биохимическим составом микроводорослей на основе разделения световых и темновых стадий фотобиосинтеза [3], из которой следует, что световое или минеральное лимитирование роста приводит к накоплению резервных углеводов и липидов.

В предварительных опытах с накопительной культурой водоросли *T. viridis* было показано, что плотность культуры увеличивается со временем практически линейно в диапазоне плотностей от 0,2 до 3,5 г(СВ)·л<sup>-1</sup>. Это указывает на то, что скорость роста культуры является величиной постоянной для данного диапазона. В накопительной культуре продуктивность составила в среднем 0,28 г(СВ)·л<sup>-1</sup>·сут<sup>-1</sup>. Такие же результаты получены и для непрерывной культуры. Но при этом удельная скорость роста ( $\mu$ ) уменьшалась с ростом плотности культуры обратно пропорционально. Фактически постоянство скорости роста означает, что данный режим выращивания представляет собой спидостат [1].

Стационарные плотности в непрерывном режиме выращивания соответствовали линейному росту накопительной культуры, и клетки микроводоросли *T. viridis* не были лимитированы по минеральному обеспечению, а продуктивность определялась только световыми условиями. В отличие от изменений плотности, биохимический состав клеток существенно зависел от плотности культуры, т.е. от световых условий.

В ходе работы была рассчитана продуктивность, которая для каждого стационарного режима составила 0,28 г·л<sup>-1</sup>·сут<sup>-1</sup>. С ростом стабилизируемой плотности культуры содержание липидов увеличивается от 0,06 до 0,31 г·л<sup>-1</sup>. Учитывая, что единственным лимитирующим фактором являются световые

условия, можно сделать вывод о прямом или косвенном влиянии света на содержание липидов. Под косвенным влиянием можно подразумевать, что содержание липидов зависит от удельной скорости роста культуры т.к. она снижается с 0,4 до 0,25 сут<sup>-1</sup>, при увеличении плотности от 0,4 до 1 г(СВ)·л<sup>-1</sup>.

Из приведенных данных видно что, при выращивании в квазинепрерывном режиме *T. viridis*, лимитированном только световыми условиями, содержание липидов достигает 30% от органического вещества или 24% от сухой массы. Из литературных данных известно, что липиды могут накапливаться при лимитировании роста азотом. Так для вида *T. suecica*, который культивировали при лимите по азоту, общие липиды достигали 29% от сухого вещества [4]. Учитывая сравнимость приведенных данных можно утверждать, что накопление липидов в клетках наблюдается как при лимитировании светом, так и азотом. Такой вывод подтверждается также данными, которые указывают, что накопление липидов может быть ответной реакцией на неблагоприятные условия для клеток микроводоросли, такие как низкая температура, освещенность и др. [5].

На основе представленных экспериментальных данных можно утверждать, что непрерывный режим культивирования позволяет получить высокое содержание общих липидов, сохраняя при этом высокую продуктивность культуры микроводоросли *T. viridis*.

Спидостатный режим культивирования, не лимитируя рост культуры микроводоросли по минеральному обеспечению, позволяет управлять содержанием общих липидов *T. viridis* и получать их максимальный выход.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Тренкеншу Р.П. Экология моря 2005, 67, 98-110.
2. Тренкеншу Р.П. Автореф. дис. канд. биол. наук: Специальность биофизика. Красноярск, 1984.
3. Тренкеншу Р.П., Новикова Т.М. Морской экологический журнал 2014, 13 (4), 71-78.
4. Bondioli P., Della Bella L., Rivolta G., Chini Zittelli G., Bassi N., Rodolfi L., Casini D., Prussi M., Chiramonti D., Tredici M. R. Bioresource Technology 2012, 114, 567-572.
5. Соловченко А.Е. Физиология растений 2012, 59, 192-202.

## LIPID CONTENT OF MICROALGAE CELLS *TETRASELMIS VIRIDIS* ROACH IN THE MODE OF DENSITY CULTIVATION

Novikova T. M.<sup>1</sup>, Trenkenshu R. P.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Sevastopol State University; <sup>2</sup>A.O. Kovalevsky Institute of Marine  
Biological Research RAS, Sevastopol, Russia

In the paper was studied influence of the mode of continuous cultivation on the content of total lipids, as well as the specific growth rate and productivity of green microalgae culture *T. viridis*. It was shown experimentally that the mode of density allowed to obtain high productivity and the content of total lipid in the culture of *T. viridis*.

---

---

## БИОТРАНСФОРМАЦИИ, КАТАЛИЗИРУЕМЫЕ ЭСТЕРАЗАМИ В ГЕТЕРОГЕННЫХ СИСТЕМАХ

Осипова И. А.<sup>1</sup>, Ремезовская Н. Б.<sup>2</sup>, Максимов А. Ю.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Пермский государственный национальный исследовательский университет;  
<sup>2</sup>Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН,  
Пермь, Россия

Показано, что при иммобилизации актинобактерий-продуцентов эстераз на каталитическом волокнистом углеводе максимальная адсорбция клеток составляет 65-67,9% для штамма *Nocardia* sp. X-19к и 86-87% для *Rhodococcus erythropolis* ПЗ-8. Обнаружена линейная зависимость адсорбции от концентрации клеток, что свидетельствует о полислойном характере сорбции. Эффективность трансформации бутилацетата свободными и иммобилизованными клетками *Nocardia* sp. X-19к была идентичной, а их удельная активность различалась менее, чем на 10%, а у других штаммов иммобилизация приводила к снижению эффективности трансформации.

**Ключевые слова:** актинобактерии, эстераза, иммобилизация, каталитический углерод, конверсия.

Эстеразы (КФ 3.1.1) – широко распространенные ферменты, гидролизующие сложные эфиры до соответствующих спиртов и кислот и участвующие в функционировании различных метаболических процессов. Эти ферменты имеют также большое практическое значение в биотехнологии ввиду возможности их использования как в реакциях гидролиза и синтеза сложных эфиров, так и в реакциях энантиоселективной этерификации и переэтерификации в органических растворителях или в водно-органических системах. В наши дни бактериальные эстеразы применяются в самых различных сферах, таких как сельское хозяйство, пищевая и фармацевтическая промышленность, биodeградация поллютантов [1]. Известно применение эстераз микро-

организмов для крупнотоннажного производства (Givaudan, Швейцария), например, ванилина из феруловой кислоты с помощью биомассы *Streptomyces setoni* [2].

Применение иммобилизованных эстераз в энантиоселективном синтезе органических соединений обусловлено повышением технологических характеристик данных процессов. Как правило, в настоящее время для иммобилизации клеток-продуцентов эстераз используют метод инкапсуляции в альгинатные гели [3], в то же время для биodeградации токсикантов применяют бактерии, адсорбированные на пенополивинилформале или полых целлюлозных волокнах [4]. Различные методы иммобилизации эстеразо-содержащих микроорганизмов дают возможность полу-



чать катализаторы с широко варьируемыми свойствами.

Целью данной работы было изучение параметров иммобилизации клеток-продуцентов эстераз на углеродном сорбенте и конверсии эфиров в гетерогенных системах.

Объекты исследования – штаммы почвенных грамположительных актинобактерий, обладающие карбоксилэстеразной активностью, из коллекции микроорганизмов лаборатории молекулярной микробиологии и биотехнологий ИЭГМ УрО РАН.

В качестве носителя для иммобилизации был использован КВУ (каталитический волокнистый углерод), синтезированный на стеклопене (предоставлен ведущим научным сотрудником Института катализа им. Г.К. Борескова СО РАН Коваленко Г.А.).

Эффективность сорбции определяли по остаточной плотности бактериальной культуры после сорбции и промывки сорбента. Гидрофобность клеток оценивали по их относительному распределению между водной фазой и фазой гексадекана (ВАТН-тест). Количественное определение эстеразной активности бактериальных культур проводили фотоэлектроколориметрическим методом с использованием в качестве субстрата *p*-нитрофенилацетата. Содержание эфиров и образующихся кислоты и спиртов в процессе конверсии определяли газовой хроматографией («Shimadzu», Япония).

Изучали зависимость адсорбции клеток от плотности культуры и времени инкубации с носителем. Обнаружили, что для штаммов *Rhodococcus erythropolis* ПЗ-8 и *Nocardia* sp. X-19к достоверные различия в проценте сорбированных клеток при повышении концентрации исходной культуры в диапазоне от 0,086 до 0,430 мг сухого веса клеток/мл наблюдались только при адсорбции в течение 30 мин. Увеличение времени инкубации бактерий в присутствии носителя приводило к небольшому снижению количества сорбированных клеток и его стабилизации на уровне 65,0-67,9% для *Nocardia* sp. X-19к и 86-87% для *R. erythropolis* ПЗ-8, независимо от исходной концентрации клеточной суспензии. В отличие от этих штаммов, для *R. erythropolis* 10л при удлинении времени инкубации до 60 мин наблюдалась прямо пропорциональная зависимость процента сорбции клеток от концентрации исходной суспензии.

Известно, что эффективность иммобилизации бактериальных клеток на углеродных носителях зависит от гидрофобности клеточной поверхности. Клетки актинобактерий обычно обладают высокой гидрофобностью, однако этот признак variabelен, различается у разных штаммов, а также может изменяться на разных стадиях роста культуры. Обнаружили, что только штамм *R. erythropolis* 10л демонстрирует достоверное линейное снижение гидрофобности в течение роста культуры, приводящее к пропорциональному снижению процента сорбции клеток. У остальных штаммов колебания гидрофобности и процента адсорбции клеток были незначительны и не зависели от стадии роста. Показано, что количество адсорбированной биомассы (мг/г сорбента) у всех исследованных бактерий в интервале до 0,43 мг с.в./мл исходной суспензии возрастало прямо пропорционально концентрации клеток. Линейная зависимость адсорбции от концентрации свидетельствует о полислойном характере сорбции актинобактерий на КВУ.

Изучали конверсию эфиров иммобилизованными клетками в сравнении с суспензионной культурой. Кинетика трансформации бутилацетата свободными и иммобилизованными клетками *Nocardia* sp. X-19к была идентичной, а их удельная активность различалась менее, чем на 10%. Для остальных исследованных штаммов иммобилизация приводила к снижению эффективности трансформации субстрата. Скорость конверсии, катализируемой клетками *R. erythropolis* 10л, снижалась при иммобилизации, в среднем, на 23,3%, для штаммов *R. erythropolis* ПЗ-8 и *Nocardia* sp. X-19к эта величина составляла от 30 до 36%, соответственно. Также при конверсии иммобилизованными клетками (кроме *Nocardia* sp. X-19к) уменьшался выход конечного исследуемого продукта – бутанола, что могло быть связано как с затруднением выхода его из клеток, так и с утилизацией этого продукта клетками в связи с изменением их энергетического статуса при иммобилизации.

Эстераза в изученных нами штаммах актинобактерий имеет мембранную локализацию и, возможно, даже ассоциирована с клеточной стенкой. Иммобилизация может затруднять процесс транспорта субстрата внутрь клетки. Ранее при иммобилизации грамотрицательных бактерий с цитозольной локализацией

эстеразы было обнаружено, что удельная активность таких клеток была выше, чем свободных клеток. Таким образом, полученные нами данные подтверждают предположение, что эффективность конверсии иммобилизованными клетками зависит от локализации ферментов клетки и механизма транспорта субстрата.

Работа поддержана грантом РФФИ 13-03-96035 p\_урал\_a.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Panda T., Gowrishankar B.S. Appl Microbiol Biotechnol 2005, 67, 160-169.
2. Ghisalpa O., Meyer H.P., Wohlgemuth R. In: Encyclopedia of industrial biotechnology: bioprocess, bioseparation, and cell technology. Wiley, New York 2010, 1-18.
3. Bhathena J. et al. Appl Microbiol Biotechnol 2007, 75 (5), 1023-1029.
4. Доронина Н. В., Назаров Н. М., Ежов В. А., Троценко Ю. А. ПБиМ 2006, 1, 52-54.

## ESTERASE-CATALYZED BIOTRANSFORMATION IN HETEROGENEOUS SYSTEMS

Osipova I. A.<sup>1</sup>, Remezovskaya N. B.<sup>2</sup>, Maksimov A. Yu.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Perm State National Research University; <sup>2</sup>Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms UB RAS, Perm, Russia

It is shown that the immobilization of esterase-producing actinobacteria on the catalytic fibrous carbon results in maximal adsorption of 65-67,9% cells for the strain *Nocardia* sp. X-19K and 86-87% for *Rhodococcus erythropolis* P3-8. Linear dependence of the adsorption on the concentration of cells was revealed, indicating the polyclonal nature of sorption. The efficiency of butyl acetate transformation by free and immobilized cells of *Nocardia* sp. X-19K was identical, and their specific activity differed by less than 10%, while the immobilization of other strains resulted in reducing the efficacy of transformation.

## АКСОНОМИЯ ТАКРОЛИМУС (FK506)-СИНТЕЗИРУЮЩЕГО ШТАММА *STREPTOMYCES* SP. ВКМ АС-2618Д И ВЛИЯНИЕ КОМПОНЕНТОВ СРЕДЫ НА АКТИВНОСТЬ ПРОДУЦЕНТА

Пошехонцева В. Ю.<sup>1,2</sup>, Суходольская Г. В.<sup>1,3</sup>, Гулевская С. А.<sup>1</sup>,  
Фокина В. В.<sup>1,3</sup>, Донова М. В.<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН;  
<sup>2</sup>Пуцинский государственный естественно-научный институт; <sup>3</sup>ООО «Фарминс»,  
Пуцино, Россия

Такролимус (FK506) – иммунодепрессант поликетидной структуры, являющийся одним из самых востребованных в медицинской практике. Штамм *Streptomyces* sp. ВКМ Ас-2618Д способен синтезировать такролимус на питательных средах сложного состава. В настоящем исследовании, на основании фенотипических, филогенетических и хемотаксономических признаков штамм отнесен к виду *Streptomyces tsukubaensis*. Установлена зависимость биосинтетической активности продуцента от условий культивирования и отдельных компонентов питательной среды, выявлены условия, обеспечивающие максимальный уровень продукции FK506.

**Ключевые слова:** такролимус, FK506, *Streptomyces tsukubaensis* ВКМ Ас-2618Д (= *Streptomyces* sp. ВКМ Ас-2618Д), иммунодепрессант, биосинтез, полифазная таксономия.

**Актуальность и цель работы.** В настоящее время природный 23-членный макроциклический поликетид такролимус (FK-506, Fujimycin) признан наиболее эффективным препаратом

для подавления отторжения трансплантированных донорских органов и тканей среди различных клинически значимых иммунодепрессантов (циклоспорины, рапамицины, микофенолаты), при минимальных побочных воздействиях. Известны свыше 20 различных штаммов рода *Streptomyces*, способных синтезировать такролимус, однако, проблемой остается невысокая продуктивность большинства известных штаммов.

Штамм *Streptomyces* sp. ВКМ Ас-2618Д способен продуцировать такролимус [1], однако, в неоптимизированных условиях максимальная достигаемая концентрация продукта не превышала 200-250 мг/л.

Целью данной работы являлось уточнение видовой принадлежности *Streptomyces* sp. ВКМ Ас-2618Д и изучение влияния компонентов среды на биосинтез FK506.

**Материалы и методы.** Штамм *Streptomyces* sp. ВКМ Ас-2618Д получен от ООО «Фарминс» и задепонирован во Всероссийской коллекции микроорганизмов (ВКМ ИБФМ РАН) [1]. Условия выращивания, поддержания, культивирования, биосинтеза и методы исследования описаны ранее [1,2]. Анализ пептидогликана клеточной стенки изучали методом Шлиффера и Кандлера [3]. Расположение спор и особенности споровой поверхности исследовали в сканирующем электронном микроскопе JEOL 6100 при контрастировании напыленным золотом.

Оптимизацию условий культивирования штамма *Streptomyces* sp. ВКМ Ас-2618Д проводили на основе изучения зависимости целевой биосинтетической активности от состава питательной среды и условий инкубирования. Концентрацию сахаров варьировали в диапазоне 5–90 г/л; органических кислот – от 0,01 до 2,0 г/л; источников неорганического азота – от 2 до 4 г/л; органического азота – в диапазоне 5–20 г/л; аминокислот – от 0,01 до 5,0 г/л; минеральных компонентов – от 0,01 до 5,0 г/л. Температуру варьировали от 18 до 35°C, pH – от 6,0 до 8,0, аэрацию – путем изменения объема среды и режима перемешивания. Поликетиды анализировали ВЭЖХ [1].

**Результаты и обсуждение.** Для штамма *Streptomyces* sp. ВКМ Ас-2618Д характерен разветвленный субстратный мицелий с воздушными гифами, дифференцирующимися в прямые цепочки спор. На крахмаловом агаре с неорганическими солями споровая мас-

са имела сероватое окрашивание. Цвет субстратного и воздушного мицелия изменялся от ярко-кирпичного до оранжево-розового и желто-оранжевого на диагностических средах, рекомендованных протоколом ISP. Наличие в пептидогликане клеточной стенки LL-диаминопимелиновой кислоты при отсутствии диагностических сахаров свидетельствовало о том, что клеточная стенка представляет первый тип, характерный для рода *Streptomyces*.

Штамм Ас-2618Д активно утилизировал D-глюкозу, D-рибозу, N-ацетилглюкозамин и глицерин; слабый рост отмечен на среде с D-сорбитом, D-мальтозой, салицином, глюконатом калия и 5-кетоглюконатом калия; обладал эстеразной, лейцин-ариламидазной, нафтол-AS-VI-фосфогидролазной и α-глюкозидазной активностей, что также характерно для представителей рода *Streptomyces*.

Содержание G+C в ДНК изучаемого штамма составило 72,4–74,5%. Филогенетическое древо, построенное на основе последовательностей гена 16S рРНК, показало, что штамм *Streptomyces* sp. ВКМ Ас-2618Д образует один кластер со штаммом *Streptomyces tsukubaensis* NRRL 18488<sup>T</sup>. Сходство в последовательности гена 16S рРНК составило 99,9%. Все вышеперечисленные характеристики позволили отнести исследуемый штамм *Streptomyces* sp. ВКМ Ас-2618Д к виду *Streptomyces tsukubaensis*.

В результате изучения зависимости биосинтетической активности штамма ВКМ Ас-2618Д от используемых источников углерода, азота, микроэлементов, а также от условий культивирования определены оптимальный состав питательной среды и режим инкубирования штамма, обеспечивающие активный синтез такролимуса. Максимальный выход такролимуса (свыше 530 мг/л) достигнут при 24-25°C, pH 6,0-7,5 и использовании среды, содержащей растворимый крахмал, кукурузный экстракт, сухие дрожжи, минеральные соли и отдельные аминокислоты, при дробном добавлении суспензии крахмала.

Использование растворимого картофельного крахмала обеспечивало более высокий уровень активности штамма в сравнении с крахмалами из кукурузы, тапиоки, гороха и др. При увеличении концентрации картофельного крахмала с 25 до 90 г/л выход такролимуса увеличивался в 5 раз. Замена крахмала на другие источники углерода (моно- и диса-

хара, органические кислоты, декстрины и др.) приводила к снижению, а в некоторых случаях к подавлению биосинтетической активности. Изучение влияния на биосинтез FK506 культурой ряда сахаров, вводимых в среду с крахмалом, показало стимулирующий эффект глюкозы (5 г/л).

Наиболее приемлемым источником органического азота являлся кукурузный экстракт. Активный биосинтез такролимуса наблюдается при добавлении в среду пекарских дрожжей, вероятно, обеспечивающих необходимый для биосинтеза FK-506 пул кофакторов, витаминов, микроэлементов и других компонентов. Показано стимулирующее действие на биосинтез такролимуса солей марганца и аминокислот – предшественников пипеколиновой кислоты. Результаты коррелируют с известными литературными данными о влиянии ионов двухвалентных

металлов на функционирование ферментов шикиматного пути и важности ряда свободных аминокислот для замыкания макролидного кольца [4].

Полученные результаты свидетельствуют о перспективности использования штамма *Streptomyces tsukubaensis* VKM Ac-2618D для биосинтеза такролимуса, и могут быть использованы для создания биотехнологического процесса.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Патент РФ № 2495937, 2012.
2. Пошехонцева В. Ю., Гулевская С. А., Донова М. В. Журнал научного фонда «Биолог» 2014, 3, 119-122.
3. Schleifer K. H., Kandler O. Bacteriol Rev 1972, 36, 407-477.
4. Barreiro C., Martínez-Castro M. Appl Microbiol Biotechnol 2013, 98 (2), 497-507.

### TAXONOMY OF THE TACROLIMUS (FK506)-PRODUCING STRAIN *STREPTOMYCES* SP. VKM AC-2618D AND INFLUENCE OF MEDIUM COMPONENTS ON PRODUCER ACTIVITY

Poshekhontseva V. Y.<sup>1,2</sup>, Sukhodolskaya G. V.<sup>1,3</sup>, Gulevskaya S. A.<sup>1</sup>,  
Fokina V. V.<sup>1,3</sup>, Donova M. V.<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms; <sup>2</sup>Pushchino State Scientific Institute; <sup>3</sup>"Pharmins", Pushchino, Russia

Tacrolimus (FK506) is a polyketide immunosuppressant the most widely used in medical practice. The strain *Streptomyces tsukubaensis* VKM Ac-2618D is capable of producing tacrolimus on complex media with starch as the main carbon source. In this research, on the basis of phenotypic, phylogenetic and chemotaxonomic analysis the strain was referred to the *Streptomyces tsukubaensis* species. Cultivation conditions and individual components of the biosynthetic medium that influence the producer biosynthetic activity were defined and optimized for the high FK506 level production.

## ЕСТЕСТВЕННАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ *STREPTOMYCES TSUKUBAENSIS* ВКМ АС-2618Д И СЕЛЕКЦИЯ ВЫСОКОАКТИВНОГО ПРОДУЦЕНТА ТАКРОЛИМУСА (FK506)

Пошехонцева В. Ю.<sup>1,2</sup>, Суходольская Г. В.<sup>1,3</sup>, Фокина В. В.<sup>1,3</sup>,  
Гулевская С. А.<sup>1</sup>, Донова М. В.<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрыбина РАН;  
<sup>2</sup>Пушчинский государственный естественно-научный институт; <sup>3</sup>ООО «Фарминс»,  
Пушино, Россия

Для высокоактивного такролимус (FK506)-продуцирующего штамма *Streptomyces tsukubaensis* ВКМ Ас-2618Д характерна морфологическая диссоциация в процессе роста и биосинтеза. Продукция такролимуса зависит от используемого селектанта; разные морфотипы отличаются по макро- и микроморфологическим характеристикам. Доля низкопродуктивных форм при диссоциации культуры увеличивается с пролонгированием процесса биосинтеза и при многочисленных пересевах. В результате исследования были определены критерии селекции наиболее активных морфотипов.

**Ключевые слова:** *Streptomyces tsukubaensis* ВКМ Ас-2618Д, такролимус, FK506, естественная изменчивость, морфотип, селектант.

**Актуальность и цель работы.** Такролимус – природный 23-членный макроциклический поликетид, широко использующийся в медицинской практике: трансплантологии, дерматологии, терапии аутоиммунных заболеваний и др., синтезируемый актиномицетами рода *Streptomyces*. Объектом изучения являлся FK506-продуцирующий штамм *Streptomyces tsukubaensis* ВКМ Ас-2618Д [1].

**Целью** настоящей работы являлось изучение морфофизиологических особенностей культуры *Streptomyces tsukubaensis* ВКМ Ас-2618Д в процессе роста и биосинтеза такролимуса, а также селекция наиболее активных диссоциантов штамма.

**Материалы и методы.** Штамм *S. tsukubaensis* ВКМ Ас-2618Д был предоставлен компанией ООО «Фарминс», г. Пушино. Штамм поддерживали на крахмалосодержащей среде, культивировали в аэрируемых условиях при температуре 24-25 °С на роторной качалке (200 об/мин) [1, 2]. Макроморфологические характеристики культуры, выращенной при температуре 30°С в течение 14 сут., исследовали согласно протоколу International Streptomyces Project (ISP) [3]. Цветовую гамму окраски воздушного и субстратного мицелия, споровой массы и растворимых пигментов оценивали по шкале RAL K5 Classic gGmbH (Germany).

Микроморфологические особенности штамма исследовали методом светлого поля или с использованием фазово-контрастной приставки, при увеличениях от 100 до 1000 раз с помощью микроскопа Nikon Eclipse 50i. Поликетиды анализировали ВЭЖХ [1].

**Результаты.** Макроморфологические характеристики штамма *S. tsukubaensis* ВКМ Ас-2618Д оценивали при росте на типовых агаризованных средах ISP-1 – ISP-5 [3] и среде МДА. Штамм проявлял диссоциацию, выразившуюся в изменении архитектоники и окраски колоний, на средах, содержащих дрожжевой экстракт (ISP-2 и МДА), и был мономорфен на других диагностических средах: ISP-1 (триптон-дрожжевой агар), ISP-3 (овсяной агар), ISP-4 (крахмаловый агар с неорганическими солями) и ISP-5 (аспарагин-глицериновый агар). При росте на МДА штамм образовывал три основных морфотипа. Культуры, выращенные из одиночных колоний разных морфотипов, различались по биосинтетической активности.

На среде МДА активный морфотип был представлен колониями ярко-кирпичного (аверс) с буровато-оранжевым (реверс) цвета, диаметром до 13 мм; колонии округлые, слабо врастающие в агар, с сухой матовой поверхностью, с возвышающейся центральной зоной, имеющей в центре округлое или неправильной фор-

мы углубление; боковые поверхности колоний имели гребневидно-морщинистую структуру и заканчивались тонким уплощенным глиновым слоем пастельно-оранжевого цвета. На микропрепаратах поверхностная зона колонии состояла из густо переплетенных гиф, в том числе – спорогенных. В жидкой фазе выявлялись свободные споры. Однако упорядоченных споровых цепей, характерных для *Streptomyces*, не было обнаружено.

Два других морфотипа (с относительно низкой продуктивностью) были представлены колониями насыщенного оранжевого и бурожелтого цвета, имеющими архитектуру, отличную от описанной выше для активного морфотипа, с более мелкими колониями. При микроскопировании выявлялись фрагментированные гифы, выступающие из сетевидных мицелиальных скоплений, вероятно, соответствующие многоклеточным спорангиоподобным репродуктивным структурам, описанным для ряда актиномицетов [4].

При росте на жидкой биосинтетической среде, 3-суточная культура активного морфотипа была представлена мицелием с параллельно ориентированными неветвящимися, либо слабо ветвящимися длинными гифами, без признаков спорообразования. Формирование мицелия сопровождалось началом биосинтеза такролимуса с постепенным увеличением продуктивности до 100-150 мг/(л·сут). В момент активного биосинтеза на 6-е сут. отмечалось начало дегенеративных изменений культуры. Деструктивные изменения продолжались, и после 10-ти сут. биосинтеза у глобулярных скоплений всех размеров уплотнялась центральная область, а наружная часть сферы

становилась более прозрачной и организованной рыхло переплетенными короткими гифами. К этому периоду скорость биосинтеза снижалась, и уровень FK506 стабилизировался.

Динамика накопления такролимуса и морфоструктурных изменений культур, выращенных из колоний двух других морфотипов, принципиально не отличались, однако, максимальный достигаемый уровень FK506 был на 10-18% ниже, чем при использовании вышеописанного наиболее активного морфотипа. В процессе биосинтеза такролимуса, а также при выращивании культуры на агаризованной биосинтетической среде происходит диссоциация штамма с образованием малопродуктивных форм. Доля менее активных морфотипов увеличивается при пересевах штамма.

Таким образом, для повышения и стабилизации биосинтетической активности популяции продуцента необходимо увеличение доли продуктивного мицелия первого морфотипа. Выявленные в данной работе микроскопические признаки могут быть использованы в качестве прогностических критериев оценки популяции при изучении влияния различных факторов оптимизации процесса.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Патент РФ № 2495937, 2012.
2. Пошехонцева В.Ю., Гулевская С.А., Донова М.В. Журнал научного фонда «Биолог» 2014, 3, 119-122.
3. Shirling E. B., Gottlieb D. Int J Syst Bacteriol 1966, 16, 313-340.
4. Хоулт Дж., Криг Н. Определитель бактерий Берджи / [под ред. акад. РАН Г.А. Заварзина]. Издательство «Мир», Москва 1997, 800 с.

## NATURAL VARIABILITY OF *STREPTOMYCES TSUKUBAENSIS* VKM AC-2618D AND SELECTION OF TACROLIMUS (FK506) HIGH-ACTIVE PRODUCER

Poshekhontseva V. Y.<sup>1,2</sup>, Sukhodolskaya G. V.<sup>1,3</sup>, Fokina V. V.<sup>1,3</sup>,  
Gulevskaya S. A.<sup>1</sup>, Donova M. V.<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms; <sup>2</sup>Pushchino State Scientific Institute; <sup>3</sup>"Pharmins", Pushchino, Russia

Morphological dissociation is a characteristic feature of the tacrolimus (FK506) high-producing strain *Streptomyces tsukubaensis* VKM Ac-2618D during its growth and biosynthesis. Tacrolimus production depends on the selectant type used; while morphotypes differ in their macro- and micromorphological characteristics. The part of low-productive dissociants is increased depending on the biosynthesis prolongation time and passage multiplicity. As a result of the study criteria for the most active morphotypes selection were identified.

## ИММОБИЛИЗАЦИЯ АКТИНОБАКТЕРИЙ РОДА *RHODOCOCCLUS* В БИОРЕАКТОРАХ РАЗЛИЧНЫХ ТИПОВ

Серебренникова М. К.<sup>1</sup>, Куюкина М. С.<sup>1,2</sup>, Ившина И. Б.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>ФГБУН Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН;

<sup>2</sup>ФГБОУ ВПО Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

Изучены закономерности процесса адсорбционной иммобилизации ассоциации алканотрофных бактерий *R. ruber* и *R. opacus* на гидрофобизованных хвойных опилках в биореакторах с механическим и циркуляционным перемешиванием. Установлено, что динамика процесса иммобилизации родококков на носителе зависит от типа биореактора и гидродинамических условий. Показано, что эффективная иммобилизация ( $1,7 \times 10^7$  клеток/г носителя) родококков на опилках достигается в колоночном биореакторе при скорости подачи клеточной суспензии 2,0 мл/мин.

**Ключевые слова:** родококки, адсорбционная иммобилизация, биореактор.

**Актуальность и цель работы.** Биологические способы очистки промышленных и коммунальных сточных вод, основанные на использовании биореакторных технологий, получают все более широкое применение. Актинобактерии рода *Rhodococcus*, осуществляющие процессы окислительной трансформации углеводов и их производных, склонные к колонизации поверхностей и синтезирующие биосурфактанты, являются перспективной группой для экологической биотехнологии [1]. В процессах очистки загрязненной воды часто применяют микроорганизмы-деструкторы в иммобилизованном состоянии, что позволяет избежать таких недостатков, как нестабильное физиологическое состояние микробной популяции при изменении условий среды; низкая жизнеспособность и каталитическая активность свободных клеток; необходимость поддержания высокой концентрации биомассы в реакционной среде [2]. Кроме того, иммобилизация микроорганизмов определяет возможность использования биореакторов различных типов и подбора оптимальных для конкретной задачи скоростных режимов.

Для равномерной адсорбции микробных клеток на носителе содержимое биореактора перемешивают механически или гидравлически с помощью внешних насосов [2]. Ис-

пользование биореакторов с механическим перемешиванием осложнено неравномерным распределением клеточной суспензии между частицами носителя, а также высокой энергозатратностью процесса. В то же время, применение гидравлических насосов позволяет создавать и поддерживать в реакторах псевдооживленный слой носителя, благодаря которому иммобилизованные клетки равномерно распределяются по орошаемой поверхности носителя [3].

**Целью работы** являлось сравнительное исследование процесса иммобилизации родококков на твердом органическом носителе в биореакторах с различным типом перемешивания.

**Материалы и методы.** В работе использовали штаммы *Rhodococcus opacus* ИЭГМ 249 и *Rhodococcus ruber* ИЭГМ 231, ИЭГМ 615 из Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов ([www.iegm.ru/iegmcol/strains](http://www.iegm.ru/iegmcol/strains)). Клетки выращивали в МПБ на орбитальном шейкере (160 об./мин, 28 °С) в течение 28 ч, дважды отмывали натрий-фосфатным буфером и ресуспендировали в нем до значения  $OP_{600}$  1,0. На основе полученных суспензий готовили ассоциацию клеток *R. opacus* и *R. ruber* (1: 1 v/v). В качестве носителя использовали гидрофобизованные хвойные опилки [4] с размером частиц

0,1-0,3 см. Адсорбционную иммобилизацию родококков на носителе проводили в биореакторах с (1) механическим и (2) гидравлическим (циркуляционным) перемешиванием. Биореактор с механическим перемешиванием представлял собой 250-мл колбу Эрленмейера, содержащую 100 мл бактериальной суспензии и 2 г носителя, закрепленную на платформе шейкера. Эксперименты проводили при постоянном перемешивании со скоростью 60; 110; 160 или 210 об./мин. Лабораторный колонный биореактор представлен стеклянной колонкой (диаметром 1,4 и высотой 14 см), заполненной опилками (2 г). В колонку, соединенную силиконовыми трубками с колбой Эрленмейера, с помощью перистальтического насоса подавали клеточную суспензию со скоростью 0,6; 1,2; 2,0 или 2,8 мл/мин. Орошая древесные опилки в направлении снизу-вверх, суспензия возвращалась в колбу, обеспечивая циркуляционное перемешивание. При скорости циркуляции суспензии 1,2 мл/мин и выше в биореакторе формировался псевдооживленный слой. Эксперименты проводили в течение 7 сут в трехкратной повторности. Процесс адсорбции контролировали по измерению показателя ОП<sub>600</sub> клеточной суспензии с помощью спектрофотометра Lambda EZ 201.

**Результаты.** Изучение сравнительной динамики иммобилизационного процесса показало, что закрепление родококков на хвойных опилках наиболее интенсивно происходило в течение первых 48 ч эксперимента. За это время в условиях колонного биореактора адсорбировалось от 51 до 90% клеток, тогда как при перемешивании величина клеточной адсорбции составила 29–56%. Насыщение поверхности опилок бактериальными клетками приводило к снижению интенсивности адсорбции родококков, что наиболее заметно при низких (60 и 110 об./мин) скоростях перемешивания. При высокоскоростных (160 и 210 об./мин) режимах уменьшение показателя ОП<sub>600</sub> происходило на протяжении 7 сут, при этом количество иммобилизованных клеток увеличивалось в 2-3 раза. В тоже время, в колонном биореакторе при минимальной (0,6 мл/мин) и максимальной (2,8 мл/мин) скорости прокачивания бактериальной суспензии зарегистрировано незна-

чительное увеличение ОП<sub>600</sub> после 72 и 96 ч, соответственно. По-видимому, это обусловлено десорбцией иммобилизованных клеток с поверхности опилок, механическим истиранием материала носителя, а также процессом фрагментации клеточного мицелия родококков [5].

По нашим данным, максимальное число (75%) родококков адсорбировалось на опилках при перемешивании со скоростью 210 об./мин, тогда как в биореакторе колонного типа максимальная (55%) степень адсорбции достигалась при скорости подачи суспензии 2,0 мл/мин. При этом каждое последующее снижение скорости орбитального перемешивания на 50 об./мин сопровождалось уменьшением эффективности иммобилизации на 9-11%. При повышении скорости прокачивания бактериальной суспензии через биореактор от 2,0 до 2,8 мл/мин не наблюдалось увеличения числа иммобилизованных клеток.

Таким образом, процесс иммобилизации родококков на хвойных опилках целесообразно проводить в биореакторе с циркуляционным перемешиванием при оптимальном скоростном режиме (2,0 мл/мин), обеспечивающем прочное закрепление клеток и достижение высокой ( $1,7 \times 10^7$  клеток/г носителя) концентрации биомассы. Использование реактора данного типа позволяет проводить иммобилизацию бактерий и очистку загрязненной воды в непрерывном режиме, обеспечивая высокую эффективность биотехнологического процесса.

Исследование поддержано грантом Российского научного фонда (14-14-00643).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kuyukina M. S., Ivshina I. B. In: *Biology of Rhodococcus*. Alvarez H. M. (ed), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg 2010, 292-313.
2. Егорова Т. А., Клунова С. М., Живухина Е. А. Основы биотехнологии. Академия, Москва 2003.
3. Werther J. Fluidized-Bed Reactors. In: *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. Wiley-VCH 2007, 50.
4. Podorozhko E. A. et al. *Bioresource Technology* 2008, 99 (6), 2001-2008.
5. Ившина И. Б. и др. Вестник ПГУ 2007, 5 (10), 107-112.



## IMMOBILIZATION OF *RHODOCOCCUS* ACTINOBACTERIA IN DIFFERENT BIOREACTOR TYPES

Serebrennikova M. K.<sup>1</sup>, Kuyukina M. S.<sup>1,2</sup>, Ivshina I. B.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, UB RAS; <sup>2</sup>Perm State National Research University, Perm, Russia

Mechanisms of adsorptive immobilization of the association of alkanotrophic bacteria from *R. ruber* and *R. opacus* on hydrophobized pine sawdust were studied in two bioreactor types, i.e. with mechanical stirring and circulation flow. The dynamics of rhodococci immobilization on a carrier appeared to depend on the bioreactor used and hydrodynamic conditions. Effective immobilization ( $1.7 \times 10^7$  cells/g carrier) of rhodococci on sawdust was achieved in the column bioreactor when cell suspension was supplied at the rate of 2.0 ml/min.

---

---

## СПОСОБНОСТЬ ПРОБИОТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ БАКТЕРИЙ РОДА *VACILLUS* К БИОАККУМУЛЯЦИИ ИОНОВ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ В ОРГАНИЗМЕ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ

Сизенцов А. Н., Барышева Е. С., Бабушкина А. Е.

ФГБОУ ВПО Оренбургский государственный университет,  
Оренбург, Россия

В публикации представлены данные по изучению биоаккумулирующей способности пробиотических препаратов на основе бактерий рода *Vacillus* ионов свинца и кадмия при создании экспериментальной интоксикации. Полученные данные свидетельствуют о эффективном использовании пробиотиков с целью снижения уровня ионов тяжелых металлов в различных тканях лабораторных животных. В ходе эксперимента было установлено, что интенсивность извлечения как ионов свинца так и ионов кадмия составляет более 50%, при этом наиболее эффективным является препарат Споробактерин.

*Ключевые слова:* *Vacillus*, биоаккумуляция, тяжелые металлы, пробиотики.

**Актуальность и цель работы.** Загрязнение окружающей среды, в первую очередь микроэлементами из группы тяжелых металлов, способствует их накоплению и, как следствие, резкому снижению биопотенциала живых систем. Как элементы-следы, некоторые тяжелые металлы (например, медь, селен, цинк) необходимы для поддержания метаболизма человеческого организма. Однако, при более высоких концентрациях они могут вести к губительным последствиям. Так, например свинец, попадая в организм человека, вызывает свинцовую интоксикацию. Особенностью металлов по сравнению с другими элементами является их тенденция к биоаккумуляции. Известно,

что способность концентрировать металлы, в том числе и тяжелые, очень широко распространена в природе среди различных микроорганизмов. Большой интерес вызывает изучение данной способности среди микроорганизмов, входящих в состав пробиотических препаратов, в частности у бактерий рода *Vacillus*.

Важным является то, что входящие в состав пробиотических препаратов микроорганизмы рода *Vacillus*, являются самоэлиминирующимися антагонистами и способны оказывать антитоксическое действие, проявляющееся в активном выведении токсичных веществ из организма, в частности тяжелых металлов [1, 2].

На основании вышеизложенных данных перед нами была поставлена цель: изучить эффективность применения пробиотиков на основе спорообразующих бактерий рода *Bacillus* при отравлении свинцом и кадмием.

**Материалы и методы.** Для исследования возможностей выведения ионов свинца и кадмия нами были выбраны пробиотические препараты, так как входящие в их состав бактерии рода *Bacillus* обладают уникальной способностью к биоаккумуляции металлов [3,4]. В качестве пробиотических препаратов нами были использованы: Споробактерин (*Bacillus subtilis* 534), Бактисубтил (*Bacillus cereus* IP 5832), Ветом-2 (*Bacillus subtilis* ВКПМ В 7048 и *Bacillus licheniformis* ВКПМ В 7038). В качестве токсиканта использовали соли тяжелых металлов: сульфат кадмия и нитрат свинца. При выборе металлов исходили из того, что они являются наиболее опасными загрязнителями окружающей среды. Все исследования были выполнены на модели групп-аналогов лабораторных животных (крыс) породы «Вистер».

С целью проведения исследования из 144 особей было сформировано двенадцать групп – шесть контрольных и шесть опытных.  $K_0$  – получала основной рацион,  $K_1$  – основной рацион с добавлением нитрата свинца из расчёта 150 мг/кг веса тела,  $K_2$  – основной рацион с добавлением сульфата свинца из расчёта 150 мг/кг веса тела,  $K_3$  – основной рацион с добавлением «Споробактерин»,  $K_4$  – основной рацион с добавлением «Бактисубтила»,  $K_5$  – основной рацион с добавлением «Ветом 2», три опытные группы получали основной рацион с добавлением нитрата свинца и пробиотиков – «Споробактерин» ( $O_1$ ), «Бактисубтил» ( $O_2$ ), «Ветом 2» ( $O_3$ ), и три опытные группы – основной рацион с добавлением сульфата кадмия и пробиотиков –  $O_4$ ,  $O_5$  и  $O_6$ , соответственно. Дозировки пробиотиков соответствовали аннотациям препаратов. Подопытные животные находились в одинаковых условиях содержания.

Соли тяжёлых металлов задавались в первый день эксперимента натошак перорально, пробиотики применяли через 12 часов после введения солей металлов с первого по седьмой день. Взятие материала проводилось с периодичностью в семь дней (фоновое исследование, седьмой, четырнадцатый и двадцать первый дни) путём убоя животных методом декапитацией.

После затравки соли металла и дачи пробиотических препаратов животные наблюдались, и проводилось взятие материала с периодичностью в семь дней (фоновое исследование, 7-й, 14-й и 21-й день) на протяжении эксперимента для отбора необходимого материала животных умерщвляли путём декапитации.

Для оценки биоаккумуляционной способности нами использовался метод атомно-абсорбционного спектрального анализа. В качестве атомно-абсорбционного спектрофотометра использовался прибор типа ААС-1 (ГДР) с набором спектральных ламп. В качестве биоматериалов нами выбраны кожный покров, костная и мышечная ткани. Пробоподготовку выполняли следующим образом: навеску биоматериала массой 5 г подвергали озолению, затем производили растворение зольных осадков в 10% азотной кислоте.

В ходе проведенных экспериментальных исследований было установлено, что наибольшей биоаккумуляционной способностью по отношению к ионам свинца обладает костная ткань, при этом как в контрольных так и в опытных группах отмечается снижение концентрации ионов свинца и кадмия на протяжении всего эксперимента. Однако для всех опытных групп процент выведения по сравнению с контрольными группами  $K_1$ ,  $K_2$ , был значительно выше и суммарные значения для ионов свинца во всех изучаемых тканях к 21 дню исследования составили 58,9% для группы  $O_1$ , 44,5% –  $O_2$  и 50,7% –  $O_3$ . Для ионов кадмия аналогичные значения в опытных группах составили для группы  $O_4$  – 61,5%, для групп  $O_5$  и  $O_6$  – 57,7% и 44,3%, соответственно.

**Результаты.** В результате определения способности бактерий рода *Bacillus*, входящих в состав исследуемых пробиотиков, к биоаккумуляции тяжёлых металлов по средству определения концентрации их в тканях лабораторных животных установили, что препараты способствуют снижению концентрации ионов свинца и кадмия во всех исследуемых тканях. При этом наибольшей аккумуляционной способностью по отношению к ионам свинца и кадмия обладает костная ткань.

Наиболее эффективным из исследуемых препаратов при отравлении ионами свинца и кадмия является пробиотический препарат Споробактерин, а наименее эффективным при

интоксикации свинцом Бактисубтил, и кадмием Ветом-2.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Сизенцов А. Н., Кван О. В., Нотова С. В., Гальченко Т. А. Вестник восстановительной медицины 2014, 2, 66-75
2. Сизенцов А. Н., Исайкина Е. Ю., Кван О. В., Сизова Е. А. Современные проблемы науки и образования 2014, 3.
3. Sizentsov A., Kvan O., Vishnyakov A., Babushkina A., Drozdova E. Life Science Journal 2014, 11 (10), 18-20.
4. Сизенцов А. Н., Кван О. В., Гальченко Т. А. Современные проблемы науки и образования 2013, 5, 503.

## ABILITY OF GENUS *BACILLUS* BASED PROBIOTIC PREPARATIONS TO BIOACCUMULATION OF IONS OF HEAVY METALS IN THE ORGANISM OF LABORATORY ANIMALS

Sizentsov A. N., Barysheva E. S., Babushkina A. E.

Orenburg State University, Orenburg, Russia

Studying of the bioaccumulating ability of probiotic preparations on the basis of bacteria of the sort *Bacillus* of ions of lead and cadmium at creation of experimental intoxication are presented in the publication. The obtained data testify to effective use of probiotics for the purpose of decrease in level of ions of heavy metals in various tissues of laboratory animals. During experiment it was established that intensity of extraction as ions of lead and ions of cadmium makes more than 50%, thus the most effective is the preparation Sporobakterin.

---

---

## ХИМИЧЕСКАЯ МОДИФИКАЦИЯ И БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ГЛИКОПОЛИМЕРОВ БАКТЕРИЙ *NIVEISPIRILLUM IRAKENSE* KBC1

Суркина А. К.<sup>1</sup>, Коннова С. А.<sup>2</sup>, Гринёв В. С.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБУН Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН;

<sup>2</sup>ФГБОУ ВПО Саратовский государственный университет им. Н. Г. Чернышевского, Саратов, Россия

Исследование биологической активности гликополимеров бактерий *Niveispirillum irakense* KBC1 показало, что данные биополимеры являются частичными антагонистами эндотоксина *Escherichia coli* O55: B5. Выявлено влияние конформации гликанов нивеиспирилл на их летальную токсичность и ингибирующее действие в отношении эндотоксина. Методами ГЖХ и МАЛДИ-МС установлено, что липид А липополисахарида *N. irakense* KBC1 представлен смесью монофосфорилированных пента-, тетра- и триацилированных форм, а также небольшим количеством дифосфорилированного пентаацилированного липида А с β-(1,6)-диглюкозамином в качестве дисахаридного остова и амидно-связанной 3-гидроксигексадекановой кислотой.

**Ключевые слова:** *Niveispirillum*, гликополимер, липид А, острая токсичность, антагонизм.

**Актуальность и цель работы.** В настоящее время актуален поиск и изучение бактериальных гликополимеров, нетоксичных для человека и животных и проявляющих характерные для классических эндотоксинов биологические

свойства. В этой связи особый интерес представляют липополисахариды (ЛПС) и капсульные полисахариды (КПС) ассоциативных азотфиксирующих бактерий рода *Niveispirillum* (реклассифицированных из *Azospirillum*), спо-

собствующих росту и урожайности ценных сельскохозяйственных культур. Целью данной работы было изучение токсичности, иммуностимулирующих и антагонистических свойств нативных и модифицированных ЛПС и КПС бактерий *N. irakense* КВС1.

**Материалы и методы.** В работе исследовались биополимеры, выделенные из бактерий *N. irakense* КВС1: ЛПС (ЛПС<sub>КВС1</sub>), полученный из капсулы липополисахарид-белковый комплекс (ЛПБК<sub>КВС1</sub>) и его освобожденное от белка (обработкой протеиназой К 15 ед./мг (Sigma)) производное (ПрКЛПБК<sub>КВС1</sub>). В качестве препарата сравнения использовали ЛПС (ЛПС<sub>Е. coli</sub>) клинического штамма *E. coli* O55: B5 (Sigma). ЛПС<sub>КВС1</sub> подвергался дефосфорилированию плавиковой кислотой (дефЛПС<sub>КВС1</sub>) и О-деацилированию методами мягкого щелочного гидролиза с использованием 0,25 М NaOH (NaOHЛПС<sub>КВС1</sub>) и обработкой концентрированным раствором аммиака (NH<sub>4</sub>OHЛПС<sub>КВС1</sub>) [1].

Состав жирных кислот (ЖК) гликополимеров в виде их метиловых эфиров определяли с помощью газожидкостной хроматографии (ГЖХ) на хроматографе GC-2010 (Shimadzu, Япония). Размер мицелл препаратов определяли в среде 199 при 37 °С на дзета-сайзере (Malvern, Великобритания). Методом МАЛДИ-МС проводили структурное исследование препарата липида А (ЛА), полученного в результате мягкого гидролиза ЛПС<sub>КВС1</sub> (4 ч, 2% АсОН). Спектры отрицательных ионов регистрировали в режиме рефлектрона на МАЛДИ масс-спектрометре TOF/TOF 5800 (AB Sciex, США) в ЦКП «Симбиоз» ФГБУН ИБФРМ РАН.

Острую токсичность определяли на белых нелинейных сенсibilизированных 3,2% D-GalN · HCl мышах. Для оценки индукции фактора некроза опухоли альфа (ФНО-α) гепаринизированную кровь смешивали с равным объемом среды 199, добавляли исследуемые гликаны (100 нг/мл) и инкубировали 24 ч при 37 °С. Мононуклеары выделяли из периферической крови условно здоровых доноров-добровольцев в градиенте плотности фиккол-урографин (1,077 г/л), инкубировали с исследуемыми препаратами (1 мкг/мл) в среде 199 24 ч при 37 °С. Для изучения антагонистических свойств за 2 ч до добавления ЛПС<sub>Е. coli</sub> аликвоты цельной крови стимулировали исследуемыми препаратами. Концен-

трацию ФНО-α и интерлейкина-10 (ИЛ-10) определяли в супернатантах иммуноферментным методом с использованием коммерческих тест-систем ЗАО «Вектор-Бест» (г. Новосибирск).

**Результаты и обсуждение.** Методом ГЖХ в составе ЛА ЛПС<sub>КВС1</sub> идентифицированы ЖК C<sub>12:0</sub>, 3ОН-C<sub>14:0</sub> и 3ОН-C<sub>16:0</sub> в соотношении 1:6:3. Профиль ЖК ЛПБК<sub>КВС1</sub> был сходен с ЛПС<sub>КВС1</sub>, однако в препарате ЛПБК<sub>КВС1</sub> обнаружены также 2ОН-C<sub>14:0</sub> и C<sub>18:1</sub> кислоты. Методом МАЛДИ-МС установлено, что ЛПС<sub>КВС1</sub> представлен смесью монофосфорилированных пента-, тетра- и три-ацилированных форм с β-(1,6)-диглюкозамином в качестве дисахаридного остова и амидно-связанной 3ОН-C<sub>16:0</sub>, а также небольшим количеством дифосфорилированной пентаацильной формы.

LD<sub>50</sub>, рассчитанные для ЛПС<sub>КВС1</sub> и ЛПБК<sub>КВС1</sub>, составили 4,5 мкг/мышь и 148 мкг/мышь соответственно, что значительно превышало LD<sub>50</sub> ЛПС<sub>Е. coli</sub> (0,14 мкг/мышь). Модификация ЛПС<sub>КВС1</sub> приводила к снижению острой токсичности более чем в 40 раз, по сравнению с нативным препаратом. LD<sub>50</sub> ПрКЛПБК<sub>КВС1</sub> составила 340 мкг/мышь. Наблюдаемый эффект мог быть связан с изменением после протеиназной обработки специфической конформации молекулы ЛПБК, что подтвердилось в эксперименте по определению размера мицелл ЛПБК и ПрКЛПБК<sub>КВС1</sub>. Полученные данные свидетельствовали об изменении оптических свойств и увеличении среднего диаметра мицелл после модификации приблизительно в 3 раза.

Все исследуемые гликаны, за исключением ПрКЛПБК<sub>КВС1</sub>, не оказывали значительного стимулирующего эффекта на синтез ИЛ-10 мононуклеарами человека. Под воздействием депротеинизированного ЛПБК<sub>КВС1</sub> содержание ИЛ-10 в культуре клеток постепенно увеличивалось с 1 ч инкубации (150 пг/мл) и достигало максимума (240 пг/мл) к 24 часу. Таким образом, значительное снижение токсичности данного препарата, по сравнению с нативным ЛПБК, может быть обусловлено его способностью индуцировать продукцию провоспалительного цитокина. Показана слабая индукция ФНО-α под воздействием ЛПС нивеиспирилл как клетками цельной крови, так и в культуре человеческих моноцитов. дефЛПС<sub>КВС1</sub> не проявлял биологическую активность, в то время как стимулирующий эффект NH<sub>4</sub>OHЛПС<sub>КВС1</sub> суще-

ственно превосходил ЛПС<sub>КВС1</sub> в эксперименте с цельной кровью. Добавление  $\text{NH}_4\text{OH}$  ЛПС<sub>КВС1</sub> в среду инкубирования приводило к увеличению синтеза ФНО- $\alpha$  до 1700 пг/мл. Тем не менее, его цитокин-индуцирующая активность была ниже почти в 2 раза в сравнении с действием ЛПС<sub>Е. coli</sub> (3600 пг/мл). При изучении антагонистических свойств исследуемых препаратов показано, что только ЛПБК<sub>КВС1</sub> полностью подавлял вызванный ЛПС<sub>Е. coli</sub> синтез ФНО- $\alpha$ , в то время как остальные гликаны являлись частичными антагонистами. Согласно литературным данным [2], максимальной эндотоксической активностью обладают ЛПС, ЛА которых представлены  $\beta$ -(1,6)-связанным дисахаридом глюкозамина, замещенным двумя фосфатными группами и шестью остатками ЖК длиной С12 и С14. В связи с этим, не вызывает удивления тот факт, что ЛПС нивейспирилл оказались значительно менее токсичны, по сравнению с ЛПС<sub>Е. coli</sub>, и не индуци-

ровали чрезмерного синтеза ФНО- $\alpha$  клетками цельной крови человека. Проведенное исследование гликанов *N. irakense* позволяет сделать вывод о том, что вариации в их ЛА оказывают существенное влияние на проявление данными биополимерами биологической активности. Изученные биополимеры безопасны для человека и животных и являются потенциальными антагонистами ЛПС<sub>Е. coli</sub>, что может быть применено в медицинской практике.

Работа выполнена при частичной поддержке гранта РФФИ № 14-04-01658, а также гранта в рамках госзадания Министерства образования и науки РФ в сфере научной деятельности по заданию 17.488.2014К.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Варбанец Л. Д., Здоровенко Г. М., Книрель Ю. А. Методы исследования эндотоксинов. Наукова думка, Киев 2006.
2. Matsuura M. Front Immunol 2013, 4 (109).

### CHEMICAL MODIFICATION AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF GLYCOPOLYMERS FROM BACTERIA NIVEISPIRILLUM IRAKENSE KBC1

Surkina A. K.<sup>1</sup>, Konnova S. A.<sup>2</sup>, Grinev V. S.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>The Russian Academy of Sciences' Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms; <sup>2</sup>Federal State-Funded Educational Institution of Higher Professional Education "Saratov State University", Saratov, Russia

Studies on the biological activity of glycopolymers from bacteria *Niveispirillum irakense* KBC1 demonstrated that these glycans act as partial antagonists of *Escherichia coli* O55: B5 endotoxin. The role of the conformation of the investigated glycans in their lethal toxicity and inhibitory effect on endotoxin was shown. By using GLC and MALDI-TOF MS it was determined that the lipid A of the lipopolysaccharide *N. irakense* KBC1 consisted of a mixture of monophosphorylated penta-, tetra-, and triacylated species and small amounts of diphosphorylated penta-acylated derivatives with  $\beta$ -(1,6)-diglucosamine bearing two amide-linked 3-hydroxyhexadecanoic residues.

## СИНТЕЗ И СВОЙСТВА ПОЛИ (3-ГИДРОКСИБУТИРАТА/ 3-ГИДРОКСИВАЛЕРАТА/3-ГИДРОКСИГЕКСАНОАТА) БИОРАЗРУШАЕМЫХ ПОЛИГИДРОКСИАЛКАНОАТОВ

Сырвачева Д. А.<sup>1,2</sup>, Жила Н. О.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Сибирский федеральный университет; <sup>2</sup>Институт биофизики СО РАН,  
Красноярск, Россия

Исследованы закономерности синтеза трехкомпонентных сополимеров П (ЗГБ/ЗГВ/ЗГГ) природным штаммом *Cupriavidus eutrophus* B10646, адаптированным к валерату натрия и гексаноату натрия – субстратам предшественникам синтеза мономеров 3-гидроксивалерата (ЗГВ) и 3-гидроксигексаноата (ЗГГ). Синтезированы образцы П (ЗГБ/ЗГВ/ЗГГ) с содержанием ЗГВ от 7 до 41 мол.% и ЗГГ от 2 до 55 мол.%. Исследованы свойства П (ЗГБ/ЗГВ/ЗГГ) и показано, что содержание мономеров ЗГГ оказывает наиболее выраженное влияние на степень кристалличности образцов, снижая значение  $C_x$  до 40%.

**Ключевые слова:** природный штамм, *Cupriavidus eutrophus* B10646, поли (3-гидроксибутират/3-гидроксивалерат/3-гидроксигексаноат), свойства.

**Актуальность и цель работы.** Полигидроксиалканоаты (ПГА) – класс природных макромолекул, среди которых описаны разнообразные по структуре полимеры, образованные мономерами различного химического строения с различной длиной С-цепи [1]. Все известные типы ПГА разделены на три группы: короткоцепочечные ПГА состоят из мономеров с длиной углеродной цепи от трех до пяти атомов ( $C_3$ - $C_5$ ), среднецепочечные ПГА – от  $C_6$  до  $C_{14}$  и длинноцепочечные ПГА – свыше  $C_{17}$  и  $C_{18}$ .

ПГА обладают комплексом полезных свойств – термопластичностью, биосовместимостью с животными тканями, антиоксидантностью, а также разрушаемостью в природной среде без образования токсичных продуктов. Все это делает перспективным их использование в сельском хозяйстве, медицине, фармакологии, пищевой промышленности и др. сферах человеческой деятельности.

Наибольший интерес вызывают сополимерные ПГА, т.к. в зависимости от состава и соотношения мономеров в ПГА их базовые физико-химические свойства меняются в широких пределах [2]. Прежде всего, это относится к степени кристалличности и температурным характеристикам – параметрам, определяющим условия переработки полимеров и характеристики получаемых изделий. Особое место среди ПГА занимают сополимеры, образованные коротко- и среднецепочеч-

ными мономерами, так как сополимеры такого типа, например, сополимеры 3-гидроксибутирата, 3-гидроксивалерата и 3-гидроксигексаноата (П (ЗГБ/ЗГВ/ЗГГ)) обладают свойствами эластомеров и характеризуются пониженной степенью кристалличности в отличие от гомогенного высококристалличного поли-3-гидроксибутирата (ПЗГБ) [3].

**Целью** настоящей работы явилось исследование способности природного штамма *Cupriavidus eutrophus* B10646 синтезировать трехкомпонентные ПГА, а также изучение их физико-химических характеристик.

**Материалы и методы.** Исследован штамм водородоокисляющих бактерий *Cupriavidus eutrophus* B10646, депонированный во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов. Бактерии культивировали в строго стерильном периодическом режиме на минеральной солевой среде Шлегеля:  $Na_2HPO_4 \times H_2O$  – 9,1;  $KH_2PO_4$  – 1,5;  $MgSO_4 \times H_2O$  – 0,2;  $Fe_3C_6H_5O_7 \times 7H_2O$  – 0,025 (г/л). Источником железа служил раствор железа лимоннокислого (5 г/л). Микроэлементы вводили в среду по прописи Хоагланда из расчета 3 мл стандартного раствора на 1 л среды. Применяли режим культивирования бактерий с лимитированием роста по азоту на первом этапе и в безазотной среде – на втором, при pH 7,0 и 30°C [4].

Культивирование бактерий проводили в гетеротрофных условиях, где в качестве основного углеродного субстрата использова-

ли глюкозу (10 г/л), а в качестве субстратов-предшественников для синтеза мономеров 3-гидроксивалерата и 3-гидроксигексаноата – соли валериановой или пропионовой кислоты и соли 3-гексановой кислоты, соответственно. Для увеличения содержания мономеров 3ГГ в сополимерах в среду добавляли акрилат натрия в качестве ингибитора пути  $\beta$ -окисления жирных кислот.

В ходе экспериментов варьировали соли C5 кислот (валерат натрия или пропионат натрия) и их концентрацию в среде (от 0,5 до 1,0 г/л). При этом гексаноат натрия и акрилат натрия в среду добавляли фиксированное количество (2,0 и 0,2 г/л, соответственно) в каждом эксперименте. Добавки предшественников в течение всего эксперимента осуществляли дробно.

Концентрацию глюкозы в среде определяли ферментно-хромогенным способом с использованием набора «Глюкоза ФКД». Урожай биомассы регистрировали по весу сухого вещества и оптическим показателям культуры. Содержание сополимера в клетках определяли хроматографией метиловых эфиров жирных кислот после метанолиза биомассы на хромато-масс-спектрометре Agilent Technologies 5975C, «Agilent» (США).

Молекулярную массу и молекулярно-массовое распределение ПГА исследовали с использованием хроматографа для гелепроницающей хроматографии Agilent Technologies 1260 Infinity (Германия).

Рентгеноструктурный анализ и определение степени кристалличности образцов ПГА выполнены на рентгеноспектрометре D8 Advance «Bruker» (Германия).

Термические свойства биополимеров исследованы методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) с помощью прибора «Mettler Toledo» (Швейцария).

**Результаты.** При культивировании бактерий на среде с валератом натрия в качестве предшественника 3ГВ мономеров выход полимера и включение в него фракций 3ГВ и 3ГГ практически не изменялись и не зависели от количества добавляемой соли. Содержание полимера в клетке составляло от 38 до 44% от веса сухой биомассы, а суммарное содержание 3ГВ и 3ГГ – 43-48 мол.%. При этом, когда концентрация валерата натрия в среде составляла 1,0 г/л, урожай биомассы и включение 3ГВ мономеров было максимальным и составляло 4,7 г/л и 41 мол.%, соответственно.

При использовании соли пропионовой кислоты в качестве предшественника синтеза 3ГВ мономеров наблюдали иную картину. Общий выход полимера и суммарное включение мономеров 3ГВ и 3ГГ увеличилось, соответственно, до 45-52% от веса сухой биомассы и 30-62 мол.%. Максимальное содержание полимера в клетке и включение в него фракции 3ГГ достигнуто при концентрации пропионата натрия 0,5 г/л и составляло 52% и 55 мол.%, соответственно. Урожай биомассы во всех экспериментах находился в диапазоне от 4 до 4,5 г/л.

Таким образом, синтезирована линейка трехкомпонентных ПГА с различным соотношением фракций 3ГВ, 3ГВ и 3ГГ. Варьируя подаваемые в среду субстраты-предшественники, а также их концентрацию получили трехкомпонентные П (3ГВ/3ГВ/3ГГ) с включением 3ГВ от 7 до 41 мол.% и 3ГГ от 2 до 55 мол.%.

С применением современных методов анализа исследованы физико-химические свойства, полученных образцов П (3ГВ/3ГВ/3ГГ). Показано, что молекулярная масса сополимерных образцов значительно ниже, чем у гомополимера П3ГВ и находилась в пределах от 480 до 719 кДа, однако четкой зависимости молекулярной массы от состава и содержания сополимеров не обнаружено. Наблюдалось явное снижение значений степени кристалличности (до 40%) по сравнению с гомополимером (76%). Показатели температурных характеристик также заметно снижены, однако зависимости значений  $T_{пл}$  от содержания 3ГВ и 3ГГ не зафиксировано.

Таким образом, установлено, что трехкомпонентные ПГА в сравнении с П3ГВ имеют более низкую степень кристалличности и более низкие значения температуры плавления и термической дегградации, что делает их более эластичными, тем самым более перспективными для изготовления различных изделий.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Valentin H. E., Steibüchel A. Appl Microbiol Biotechnol 1994, 40, 699-709.
2. Laycock B, Halley P, Pratt S, et al. Prog Polym Sci 2013, 38, 536-583.
3. Sudesh K, Abe H, Doi Y. Prog Polym Sci 2000, 25, 1503-1555.
4. Волова Т. Г., Калачева Г. С., Константинова В. М., Пузырь А. П. Прикл. биохимия и микробиология 1992, 28 (2), 221-229.

## SYNTHESIS AND PROPERTIES OF POLY (3-HYDROXYBUTYRATE-CO-3-HYDROXYVALERATE-CO-3-HYDROXYHEXANOATE) BIODEGRADABLE POLYHYDROXYALKANOATE

Syrvacheva D. A.<sup>1,2</sup>, Zhila N. O.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Siberian Federal University; <sup>2</sup>Institute of Biophysics of SB of RAS, Krasnoyarsk, Russia

The study investigates synthesis of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate-co-3-hydroxyhexanoate) (P (3HB-co-3HV-co-3HHx)) terpolymers by the wild-type strain *Cupriavidus eutrophus* B10646 adapted to sodium valerate and sodium hexanoate – the precursors substrates for synthesis of 3-hydroxyvalerate (3HV) and 3-hydroxyhexanoate (3HHx) monomer units. Samples of P (3HB-co-3HV-co-3HHx) were synthesized with different molar fractions of 3HV from 7 to 41 mol.% and 3HHx from a few mol.% to 55 mol.%. The study of P (3HB-co-3HV-co-3HHx) terpolymers shows that the molar fraction of 3HHx has the strongest influence on the degree of crystallinity of terpolymer samples, decreasing the Cx to 40%.

---

## ОСОБЕННОСТИ ПРОЦЕССА БИОТРАНСФОРМАЦИИ БЕТУЛИНА

Тарасова Е. В.

Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь, Россия

Исследованы особенности процесса биотрансформации бетулина в относительно высоких концентрациях с использованием штамма *R. rhodochrous* ИЭГМ 66 из Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов. Установлено, что окислительная биотрансформация бетулина протекает благодаря адгезии актинобактериальных клеток к тритерпеновому субстрату. Показано, что бетулин в концентрации 1,0-3,0 г/л не оказывал ингибирующего влияния на дыхание бактериальных клеток, при этом выход целевого продукта через 96 ч составлял 60-74%.

**Ключевые слова:** биотрансформация, *Rhodococcus*, пентациклические тритерпеноиды, бетулин.

**Актуальность и цель работы.** В качестве стартового соединения для получения фармакологически активных соединений широко используется доступный растительный тритерпеноид бетулин, окисленные производные которого проявляют противовоспалительную, гепатопротекторную, противоопухолевую, противовирусную активность. В настоящее время предпринимаются попытки биологической трансформации бетулина с помощью микроорганизмов. Примеры по биотрансформации бетулина пока немногочисленны и связаны преимущественно с использованием грибов *Armillaria*, *Aspergillus*, *Chaetomium*, *Cunninghamella*, *Microsporium*, *Trichophyton*. При этом большинство исследованных культур катали-

зируют окисление первичной гидроксильной группы бетулина с образованием бетулиновой кислоты [1,2]. Недавно появились сведения о региоселективном окислении бетулина до бетуллона, перспективного интермедиата в синтезе противоопухолевых агентов, с использованием дрожжей *Rhodotorula mucilaginosa* F10 [3] и грибов *Dothideomycete* sp. HQ 316564 [4]. Однако описанные процессы биотрансформации бетулина в бетуллон растущими клетками грибов и дрожжей характеризуются значительными недостатками, как то: использованием бетулина в низких (0,1 и 0,057 г/л) концентрациях; высокой продолжительностью (до 144 ч) процесса биотрансформации; образованием побочных метаболитов.



Ранее на основе генофонда Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов (официальный акроним коллекции ИЭГМ, номер во Всемирной федерации коллекций культур 768, [www.iegm.ru/iegmcol](http://www.iegm.ru/iegmcol)) была показана способность родококков к эффективной биотрансформации бетулина с образованием бетуллона [5]. Отобран штамм *R. rhodochrous* ИЭГМ 66, эффективно катализирующий образование бетуллона (60%), подобраны оптимальные условия процесса биотрансформации бетулина (0,5 г/л) с использованием нерастаущих клеток родококков.

**Цель работы** – исследование особенностей процесса биотрансформации бетулина в относительно высоких (1,0; 2,0; 3,0 г/л) концентрациях.

**Материалы и методы.** В работе использовали штамм *R. rhodochrous* ИЭГМ 66 из Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов. Родококки предварительно выращивали в мясопептонном бульоне в течение 48 ч. Осажденную центрифугированием биомассу трижды промывали, ресуспендировали в 100 мл фосфатного буфера (рН 8,0) и доводили оптическую плотность клеточной суспензии до значения  $OD_{600}$  2,6. Бетулин вносили в виде раствора в диметилсульфоксиде в концентрации 1,0; 2,0 или 3,0 г/л, при этом наблюдалось образование мелкодисперсного осадка, представленного твердыми частицами. Продолжительность экспериментов по биотрансформации бетулина нерастаущими клетками составляла 96 ч. Дыхательную активность родококков определяли с помощью 6-канального респирометра Micro-Охумax® (Columbus Instruments, США). Цитоморфологические исследования проводили методом фазово-контрастной микроскопии с использованием микроскопа Axiostar plus (Carl Zeiss, Германия). Визуализацию бактериальных клеток осуществляли с помощью интегрированной системы микрокопирования, состоящей из лазерного конфокального микроскопа Olympus FV1000 (Olympus Corporation, Япония) и атомно-силового микроскопа (АСМ) Asylum MFP-3D (Asylum Research, США). Бетулин и продукты его биотрансформации экстрагировали этилацетатом. Качественный и количественный состав метаболитов определяли методом тонкослойной хроматографии, а также хромато-масс-спектрометрии с помощью

хроматографа Agilent 6890N/5975B (Agilent technology, США).

**Результаты.** По нашим данным, родококки в присутствии бетулина образуют гетерогенные агломераты, состоящие из бактериальных клеток и твердых частиц. Показано, что повышение (в 2-6 раз) концентрации вносимого бетулина приводило к увеличению размера агломератов. Результаты конфокальной лазерной сканирующей микроскопии свидетельствовали о сохранении высокого уровня жизнеспособности родококков в составе агломератов. Влияние гидрофобного субстрата на морфологию клеточной поверхности родококков в процессе биотрансформации бетулина оценивали с применением АСМ. В присутствии 1,0-3,0 г/л бетулина на поверхности бактериальных клеток визуализировали неровности различного масштаба, представляющие собой адсорбированные частицы бетулина. Анализ полученных АСМ-изображений свидетельствует о том, что процесс окислительной биотрансформации бетулина родококками протекает благодаря непосредственной адгезии бактериальных клеток к тритерпеновому субстрату.

В процессе исследования респираторной активности родококков установлено, что бетулин в концентрации от 1,0 до 3,0 г/л не оказывал ингибирующего влияния на дыхание бактериальных клеток. При этом скорость потребления  $O_2$  практически не зависела от концентрации вносимого бетулина и достигала максимальных значений в течение первых 24 ч эксперимента. В данный период регистрировалась наибольшая каталитическая активность родококков в отношении 1,0, 2,0, 3,0 г/л бетулина с образованием 56,8, 51,7 и 40% бетуллона соответственно. В последующие часы наблюдалось постепенное снижение и стабилизация интенсивности дыхания и каталитической активности родококков. Максимальный выход целевого продукта достигался через 96 ч и составлял 60-74%. Следует отметить, что в процессах биотрансформации бетулина в бетуллон с применением растущих клеток грибов *Dothideomyces* и дрожжей *Rhodotorula* уровень биоконверсии бетулина не превышал 43,4 и 52,6% соответственно при использовании значительно меньших концентраций субстрата.

В результате проведенных исследований установлено, что родококки характеризуются высоким уровнем каталитической и дыхательной активности в условиях внесения повы-

шенных концентраций бетулина. С использованием методов микроскопического анализа выявлена выраженная тенденция к агрегации актинобактериальных клеток с частицами тритерпенового субстрата и формированию устойчивых гетерогенных агломератов.

Исследование выполнено в рамках ГЗ 6.1194.2014/К Минобрнауки России и поддержано грантом РФФИ (№ 14-04-96017-р\_урал\_a).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Chen Q-H., Liu J., Zhang H-F., He G-Q., Fu M-L. *Enzyme Microb Tech* 2009, 45, 175-180.
2. Feng Y., Li M., Liu J., Xu T. Y., Fang R. S., Chen Q. H., He G. Q. *Food Chem* 2013, 136, 73-79.
3. Liu H., Lei X-L., Li N. *J Mol Catal B-Enzym* 2013, 88, 32-35.
4. Mao D-B., Feng Y-Q., Bai Y-H., Xu C-P. *J Taiwan Inst Chem E* 2012, 43, 825-829.
5. Grishko V. V., Tarasova E. V., Ivshina I. B. *Process Biochem* 2013, 48, 1640-1644.

## SPECIAL ASPECTS OF BETULIN BIOTRANSFORMATION

Tarasova E. V.

*Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, RAS, Perm, Russia*

The biotransformation process at high betulin concentrations using *R. rhodochrous* IEGM 66 strain from the Regional Specialized Collection of Alkanotrophic Microorganisms was studied. The oxidative betulin biotransformation was found to occur by the adhesion of actinobacterial cells to triterpene substrate. Betulin at high initial concentrations (1.0 to 3.0 g/L) did not inhibit respiration of bacterial cells, and betulone production reached 60–74% within 96 h.

## ИЗУЧЕНИЕ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ЭТАНОЛЬНЫХ ЭКСТРАКТОВ КУСТИСТЫХ ЛИШАЙНИКОВ ЯКУТИИ

Тарасова Л.А.<sup>1</sup>, Ахременко Я.А.<sup>1</sup>, Прокопьев И.А.<sup>2</sup>,  
Поляниченко А.А.<sup>1</sup>, Бейноева Я.С.<sup>1</sup>, Федоров А.А.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГАОУ ВПО «Северо-Восточный Федеральный университет им. М.К. Амосова»;

<sup>2</sup>ФГБУН Институт биологических проблем криолитозоны СО РАН,  
Якутск, Россия

Целью исследования являлось изучение антимикробной активности этанольных экстрактов лишайников *Cladonia stellaris*, *Flavocetraria cucullata*, *Evernia esorediosa*, *Cladonia arbuscula*, *Cladonia amaurocraea* в отношении контрольных штаммов *Enterococcus faecalis* ATCC<sup>®</sup> 29212, *Escherichia coli* ATCC<sup>®</sup> 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC<sup>®</sup> 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC<sup>®</sup> 29213. Определение антибиотической активности этанольных экстрактов лишайников проводили методом серийных разведений с определением минимальной ингибирующей и бактерицидной концентраций. Сильный бактерицидный и бактериостатический эффект в достаточно низких концентрациях все экстракты проявляли относительно грамположительных бактерий (МИК 1,5-6,2 мг/мл, МБК 3,1-6,2 мг/мл). В то же время, аналогичный эффект этанольных экстрактов лишайников в отношении грамотрицательных бактерий наблюдался в концентрациях более высоких: МИК экстрактов колебалась в пределах 12,5-6,2 мг/мл, МБК – 12,5-25 мг/мл. Таким образом, полученные в результате исследования данные свидетельствуют о достаточно высокой противомикробной активности спиртовых экстрактов протестированных лишайников.

**Ключевые слова:** лишайник, антибиотикорезистентность, лекарственная устойчивость, фитопрепарат.

**Актуальность и цель работы.** Несмотря на бурное развитие химической промышленности, проблема поиска новых растительных источников лекарственных веществ остается актуальной. Фитопрепараты привлекают исследователей рядом положительных свойств: высокая эффективность при низкой токсичности, широкий спектр действия и относительная дешевизна по сравнению с синтетическими средствами.

Республика Саха (Якутия) обладает огромным резервом биологически активных веществ растительного происхождения. Особый интерес представляет изучение лишайников, произрастающих на территории Якутии. Лишайники издавна используются в качестве антимикробного средства в народной медицине. Высокая антибиотическая активность связана с действием лишайниковых кислот и, прежде всего, усниновой кислоты, ингибирующая активность которой в отношении грамположительных бактерий, микобактерий и грибов была доказана рядом исследований [1,2].

Кроме усниновой кислоты, в настоящее время известно порядка 500 соединений относящихся к группе лишайниковых кислот, многие из которых обладают антибиотическими свойствами [4].

**Цель** – выявить антибактериальную активность этанольных экстрактов эпигейных и эпифитных видов кустистых лишайников (семейства *Cladoniaceae*, *Parmeliaceae*), произрастающих в климатических условиях Центральной Якутии, в отношении условно-патогенных и патогенных микроорганизмов.

**Материалы и методы.** Воздушно-сухие галломы лишайников массой 1 г экстрагировали 10 мл 96% этанола в течение 24 ч. Полученные экстракты фильтровали.

Определение антибиотической активности этанольных экстрактов лишайников проводили методом двухкратных серийных разведений. В качестве тест-культур использовали контрольные штаммы Американской коллекции типовых культур: *Enterococcus faecalis* ATCC<sup>®</sup> 29212, *Escherichia coli* ATCC<sup>®</sup> 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC<sup>®</sup> 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC<sup>®</sup> 29213. Культивирование тестовых культур проводили в жидкой питательной среде МПБ. Тестирование проводилось в 2 мл каждого разведения экстрактов с конечной концентрацией тест-

культур  $5 \times 10^5$  КОЕ/мл. Определяли минимальные ингибирующую и бактерицидную концентрации.

Поскольку в исследовании использовались 96% этанольные экстракты, для определения истинной антибиотической активности лишайников параллельно определялась активность 96% этилового спирта в отношении тех же тест-культур с использованием аналогичной методики.

**Результаты.** Для определения антибиотического эффекта этанольных экстрактов в качестве контроля использовали 96% этиловый спирт. Было установлено, что бактериостатическое и бактерицидное воздействие 96% спирта проявлялось в основном в разведениях в 2 и 4 раза соответственно. В двух случаях подавление роста и гибель бактерий *E. coli* были вызваны спиртом, а не действием экстрактов (*Cladonia stellaris*, *Flavocetraria cucullata*).

Полученные в результате исследования данные свидетельствуют о достаточно высокой противомикробной активности этанольных экстрактов эпигейных и эпифитных видов кустистых лишайников (семейства *Cladoniaceae*, *Parmeliaceae*), произрастающих в климатических условиях Центральной Якутии, в отношении условно-патогенных и патогенных микроорганизмов.

Исследование показало, что выраженность антибактериальной активности зависит от рода тестируемого микроорганизма. Наибольшая выраженность антибиотического действия спиртовых извлечений из лишайников отмечена в отношении грамположительных бактерий. Сильный бактерицидный и бактериостатический эффект в достаточно низких концентрациях все экстракты проявляли относительно *S. aureus* (МИК 1,5-6,2 мг/мл, МБК 3,1-6,2 мг/мл) и *E. faecalis* (МИК 1,5-6,2 мг/мл, МБК 3,1-6,2 мг/мл). В то же время, аналогичный эффект этанольных экстрактов лишайников в отношении грамотрицательных бактерий наблюдался в концентрациях более высоких. Для *E. coli* МИК экстрактов колебалась в пределах 12,5-6,2 мг/мл, МБК – 12,5-25 мг/мл. Относительно *P. aeruginosa* подавление роста отмечалось при использовании концентрации экстракта 12,5-6,2 мг/мл, полная гибель – так же 12,5-6,2 мг/мл.

Изучаемые этанольные экстракты лишайников обладали различным противомикробным действием. Так, наиболее широкий спектр

активности и наименее низкие МИК и МБК для большинства микроорганизмов выявлены у экстрактов *Evernia esorediosa*, *Cladonia arbuscula* и *Cladonia amaurocraea*. Отличия в противомикробной активности спиртовых экстрактов разных видов лишайников, по-видимому, объясняются различным качественным и количественным содержанием БАВ в них. Поскольку экстракты представляют собой смесь биологически активных веществ лишайников, их антимикробная активность может быть обусловлена результатом действия, как отдельных компонентов, так и их взаимодействия, которое оказывает различное влияние

на общую активность экстрактов. В связи с этим, в дальнейшем необходимо оценить антимикробное действие лишайниковых кислот по отдельности.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Подтероб А. Б. Химико-фармацевтический журнал 2008, 42 (10), 32-38
2. Lauterwein M., Oethinger M., Belsner K., Peters T., Marre R. Antimicrob Agents Chemother 1995, 39 (11), 2541.
3. Слонов Т. Л., Слонов Л. Х. Известия Кабардино-Балкарского государственного университета 2013, 3 (3), 40-45.

### STUDY OF ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF ETHANOL EXTRACTS FROM LICHENS OF YAKUTIA

Tarasova L. A.<sup>1</sup>, Akhremenko Y. A.<sup>1</sup>, Prokopiev I. A.<sup>2</sup>, Polyanichenko A. A.<sup>1</sup>, Beinoeva Y. S.<sup>1</sup>, Fedorov A. A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Norht-eastern Federal University; <sup>2</sup>Institute of Biological Problems of the Permafrost Zone SB RAS, Yakutsk, Russia

The aim of this study was to investigate the antimicrobial activity of ethanol extracts of the lichens *Cladonia stellaris*, *Flavocetraria cucullata*, *Evernia esorediosa*, *Cladonia arbuscula*, *Cladonia amaurocraea* against *Enterococcus faecalis* ATCC<sup>®</sup> 29212, *Escherichia coli* ATCC<sup>®</sup> 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC<sup>®</sup> 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC<sup>®</sup> 29213. The antimicrobial activity was estimated by the determination of the minimal inhibitory and bactericidal concentration by the broth dilution method. All extract compounds were highly active against gram-positive microorganisms with minimum inhibitory concentration values ranging from 1,5 to 3,1 mg/ml and minimum bactericidal concentration – 3,1 to 6,2 mg/ml. Inhibitory activity of ethanol extracts on gram-negative bacteria was detected in the concentration values ranging 6,2-12,5 mg/ml, bactericidal effect – 12,5-25 mg/ml. Present study showed that tested lichen compounds demonstrated a strong antimicrobial effect. This suggests that these lichens can be used as new sources of the natural antimicrobial agents.

### ФОСФАТСОЛЮБИЛИЗИРУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ ЭНДОФИТНЫХ БАКТЕРИЙ, АССОЦИИРОВАННЫХ С ПРЕДСТАВИТЕЛЯМИ СЕМЕЙСТВА РОАСЕАЕ

Шаравин Д. Ю., Ковалевская Н. П.

Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь, Россия

Была исследована фосфатсольюбилизирующая способность галотолерантных эндофитных азотфиксирующих, нитратредуцирующих и денитрифицирующих бактерий, выделенных с листовой поверхности проростков пшеницы, овса и ржи. Установлено, что интенсивность и начало процесса высвобождения фосфатов в среду галотолерантными бактериями зависит от симбиотической принадлежности к конкретной злаковой культуре. Примечательно, что эндофитные бактерии – симбионты ржи более активно синтезируют органические кислоты, чем симбионты пшеницы, тем самым ускоряя процесс фосфатсольюбилизации.

Ключевые слова: эндофитные бактерии, сольюбилизация фосфатов почвы.

**Актуальность и цель работы.** Фосфор – один из базовых элементов минерального питания, недостаток которого угнетает рост сельскохозяйственных растений. Усвоение фосфатов растениями полноценно происходит только на кислых почвах – подзолистых и торфяных, – в которых фосфат кальция под действием кислот постепенно переходит в доступный растениям дигидрофосфат кальция. Из-за высокой стоимости многие развивающиеся страны практически не используют химические фосфорные удобрения. В связи с этим актуален вопрос о разработке биотехнологических подходов для повышения усвояемости растениями фосфатов из труднорастворимых минералов почвы. Микробная фосфатсольubilization может служить основой для разработки биофосфорных удобрений.

**Целью** настоящего исследования являлось выделение галотолерантных эндофитных бактерий – симбионтов злаковых культур и изучение их фосфатсольubilизирующей активности.

**Материалы и методы.** Штаммы галотолерантных бактерий выделяли с листовой поверхности проростков злаковых растений: 1) овёс посевной (*Avena sativa*) сорт Спринт–2; 2) рожь посевная (*Secale cereale*) сорт Саратовская-5; 3) пшеница мягкая (*Triticum aestivum*) сорт Горноуральская. Семена растений проращивали в стерильном песке 7-10 суток. Бактериальную суспензию, полученную при смыве с листовой поверхности проростков физиологическим раствором, рассеивали на агаризованную среду «Гальченко» [1] с 5 г/л глюкозы и 1% NaCl. Селекцию азотфиксирующих, нитратредуцирующих и денитрифицирующих бактерий проводили на безазотистой среде либо с использованием  $KNO_3$  или  $NH_4Cl$  (1 г/л). Способность к растворению фосфатов анализировали двумя способами: 1) качественная реакция с индикатором метиловым красным (появление красных зон вокруг колоний растущих на агаризованной среде с нерастворимыми фосфатами); 2) спектрофотометрическое определение фосфора по образованию окрашенного комплекса малахитовой зеленой с фосфорномолибденовой кислотой в культуральной жидкости (в качестве источника фосфора использовался гидроксиапатит, который при снижении pH среды ниже 7,0 переходил в растворимые формы фосфора). Подсчёт численности бактерий проводили

методом предельных разведений на агаризованной минеральной среде с глюкозой и  $NH_4Cl$  по появлению колониеобразующих единиц (КОЕ/мл). Содержание индолил-3-уксусной кислоты (ИУК) определяли методом Сальковского (0,05М  $FeCl_3$  в 35%  $HClO_4$  при 540 нм) при добавлении в культуральную среду L-триптофана по калибровочной кривой, построенной с использованием стандартных растворов ИУК [2].

**Результаты.** С листовой поверхности проростков овса, пшеницы и ржи были выделены штаммы галотолерантных эндофитных бактерий (азотфиксирующие – ПА, РА1, РА2; нитратредуцирующие – ПН, РН; денитрифицирующие – ПД, РД1, РД2). На примере наиболее активных из известных в литературе штаммов показано, что наиболее эффективно высвобождают фосфаты штаммы, стехиометрически окисляющие глюкозу до глюконовой и кетоглюконовой кислот. При этом глюкоза сначала полностью окисляется в эти кислоты, которые вызывают растворение фосфатов и начинают усваиваться микроорганизмами только после окисления всей глюкозы в среде. При периодическом культивировании исследуемых штаммов на минеральной среде с глюкозой в присутствии избыточного количества (12 мМ) нерастворимых в воде фосфатов на протяжении 10 суток во всех культурах было отмечено снижение pH среды от 6,30 до 3,85. Численность всех групп бактерий (азотфиксирующие –  $1-4 \times 10^6$ ; нитратредуцирующие –  $1-2 \times 10^8$ ; денитрифицирующие –  $3-9 \times 10^6$ , кл/мл) к концу эксперимента снижалась в 100-1000 раз. На агаризованной минеральной среде «Г» со смесью нерастворимых в воде фосфатов (12 мМ) через 10 суток культивирования вокруг растущих колоний образовывались зоны просветления. Примечательно, что с индикатором метиловым красным характерные красные ореолы вокруг колоний были зафиксированы только с бактериальными штаммами, выделенными с проростков ржи (РА2, РД2, РН). Размеры окрашенных областей вокруг колоний составляли от 4 до 8 см в диаметре.

Периодическое культивирование бактерий на среде «Г» с гидроксиапатитом (19 мМ, pH среды 7,9) показало, что уже через сутки происходит закисление среды. Через 8 суток водородный показатель среды для культур соответствовал ПА – 6,17, РА1 – 5,74, РА2 – 5,86,

ПН – 6,11, РН – 5,77, ПД – 6,08, РД1 – 5,87, РД2 – 6,48. Спектрофотометрическое определение растворимых в воде фосфатов показало, что уже через 3 суток все бактериальные штаммы, выделенные с листовой поверхности ржи, проявляли фосфатсольбилизирующую активность. Эндофитные бактерии (ПД, ПА, ПН), изолированные с пшеницы, начинали высвобождать фосфаты только через 4 суток. Следует отметить, что максимальная концентрация растворимых фосфатов в культуральной жидкости была зафиксирована у азотфиксирующего симбионта ржи РА1 (4,66 мМ), а минимальная у азотфиксирующего симбионта пшеницы ПА (0,951 мМ). За 4 суток извлечение растворимых форм фосфора в среде с гидроксиапатитом составило для штаммов ПА – 5%, РА1 – 24,5%, РА2 – 11,7%, ПН – 9,7%, РН – 14,4%, ПД – 17,7%, РД1 – 11,7%, РД2 – 17,8%. В стерильной среде с гидроксиапатитом через 8 суток инкубации контрольных колб при 29°C растворимые формы фосфора спектрофотометрически не были обнаружены.

При росте на среде «Г» с растворимыми фосфатами ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) численность бактерий через 2-3 суток для всех исследуемых культур достигала до  $10^8$  кл/мл. Однако на минеральной среде с гидроксиапатитом их рост сильно тормозился и через 8 суток титр клеток увеличивался только до  $10^7$  кл/мл. На протяже-

нии всего эксперимента ни в одной из культур не удалось обнаружить синтеза индолил-3-уксусной кислоты.

Таким образом, в результате проведенных экспериментов было установлено, что эндофитные бактерии злаковых культур в условиях недостатка растворимых форм фосфора в среде могут извлекать его из труднорастворимых минералов почвы. Микробный синтез органических кислот приводит к закислению почвы и способствует повышению концентрации растворимых фосфатов. Установлено, что процесс сольбилизации фосфатов галотолерантными бактериями – симбионтами ржи происходит интенсивнее, чем у симбионтов пшеницы. Следует отметить, что фосфатсольбилизация тормозит развитие бактериальных культур и, возможно, ингибирует синтез фитогормонов.

Работа поддержана Программой УрО РАН «Молекулярная и клеточная биология» (№ 01201256858).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гальченко В. Ф. Метанотрофные бактерии. ГЕОС, Москва. 2001.
2. Gogleva A. A., Kaparullina E. N., Doronina N. V., Trotsenko Y. A. Syst and Appl Microbiol 2011, 34, 477-481.

### PHOSPHATE–SOLUBILIZING ACTIVITY OF ENDOPHYTIC BACTERIA ASSOCIATED WITH REPRESENTATIVES OF THE FAMILY POACEAE

Sharavin D. Y., Kovalevskaya N. P.

*Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, RAS, Perm, Russia*

The phosphate–solubilizing activity (PSA) of the endophytic halotolerant nitrogen-fixing, nitrate reducing and denitrifying bacteria isolated from wheat, rye and oats leaf surface was studied in this work. The origin and intensity of phosphate release process under the impact of halotolerant bacteria depends on symbiotic link with specific cereal. Notably that rye's endophytic symbionts synthesize organic acids rather actively than the wheat ones, thus intensifying the PSA.

## ПОТЕНЦИАЛЬНОЕ БИМЕДИЦИНСКОЕ НАЗНАЧЕНИЕ СЕЛЕНИЗИРОВАННОГО МИЦЕЛИЯ ВЫСШИХ ГРИБОВ

Цымбал О. А.<sup>1</sup>, Цивилева О. М.<sup>2</sup>, Панкратов А. Н.<sup>1</sup>,  
Маркин А. В.<sup>1</sup>, Аткин В. С.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ГОУ ВПО Саратовский государственный университет им. Н. Г. Чернышевского;

<sup>2</sup>ФГБУН Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук, Саратов, Россия

Высшие грибы рассматриваются как перспективное экологически чистое сырье для создания лечебно-профилактических и медицинских препаратов. Особый интерес представляют обогащенные селеном субстанции грибного происхождения благодаря их доступности, биосовместимости, доказанной биологической активности. Актуальность биомедицинского применения селена несомненна. К настоящему времени стало очевидным резкое снижение токсичности вводимого в организм селена при переходе от селенита натрия к элементному Se. Отраженный в настоящей работе подход позволяет получить субмикроразмерные частицы элементного селена с использованием культур съедобных грибов.

**Ключевые слова:** высшие грибы, биомедицинское назначение, селенизированный мицелий, физико-химические методы исследования.

**Актуальность и цель работы.** Базидиальные культивируемые грибы рассматриваются как перспективное экологически чистое сырье для создания лечебно-профилактических и медицинских препаратов широкого спектра действия. Особый интерес представляют полисахариды грибного происхождения, в том числе хитин – благодаря свойствам восстанавливающего и стабилизирующего субмикроструктуры матрикса, наряду с доступностью, биосовместимостью, радиопротекторным, антибактериальным свойствам.

Актуальность биомедицинского применения селена базируется на том, что селен как биокатализатор и активный компонент многочисленных ферментов необходим для правильного функционирования иммунной системы, обладает антимуtagenным, антиканцерогенным эффектом; играет протективную роль при окислительном стрессе, приводя к улучшению гематологических параметров и снижению уровня пероксидного окисления липидов клеточных мембран. В обсуждаемом аспекте альтернативы наноразмерной Se (0) форме селена практически нет, поскольку к настоящему времени стало очевидным резкое снижение токсичности вводимого в ор-

ганизм селена при переходе от селенита натрия, селенометионина, метилселеноцистеина к элементному субмикроселену, и при этом сохранение положительной регуляторной функции экзогенного селена в отношении селеноферментов.

Используемые в настоящее время способы получения субмикроселена не слишком привлекательны с разных точек зрения. Наряду с чисто химическими, дорогостоящими и неэкологичными методиками, это восстановление селенита до элементного серого селена некоторыми бактериальными культурами, аэробный биогенез наносфер селена бациллами из почвы каменноугольных шахт, практически общепринятый лабораторный метод получения красного селена *in vitro* из селенита и бычьего сывороточного альбумина (использование чистого белка).

Привлекательна идея биотрансформации ксенобиотических элементоорганических соединений, сопровождающейся восстановлением и стабилизацией элемента в нулевой степени окисления. В нашей работе роль биологического компонента отводится мицелиальным грибным культурам, роль изучаемого элемента – селену. Такой подход в конечном итоге

позволит получить субмикроразмерные частицы элементного селена с использованием микологических культур, питательные среды выращивания которых как среды для синтеза и стабилизации наночастиц сами по себе в полной мере удовлетворяют критериям “зеленой” химии

**Цель данной работы** – скрининг биотрансформирующей способности культур макробазиномицетов в отношении селенорганического соединения 1,5-дифенил-3-селенпентандиона-1,5 (диацетофенонилселенид, бис (бензоилметил) селенид, препарат ДАФС-25); разработка экспериментальных подходов к получению субмикроструктурированного селена для его дальнейшего использования.

**Материалы и методы.** Для характеристики селенизированного мицелия использовали методы рентгенофазового анализа, спектроскопии комбинационного рассеяния, энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии, сканирующей электронной микроскопии. Для выяснения форм селена, полученного в мицелии грибов, применяли метод КР. Измерение спектров КР проводили с использованием зондовой нанолаборатории Интегра Спектра (НТ-МДТ, г. Зеленоград, Россия). Регистрировали также спектры препарата ДАФС-25, цистеина, селена серого и красного (полученного *in vitro*). В качестве контрольного образца использовали серый (99.99 масс. %-ный) селен. Грибные культуры характеризовали соотношением красной (линия при  $245\text{ см}^{-1}$ ) и серой (сигнал при  $230\text{ см}^{-1}$ ) модификаций селена, образовавшегося в ходе биодеструкции органического селенида. Детектирование Se осуществляли при использовании исходной концентрации препарата ДАФС-25 в среде культивирования выше  $10^{-5}$  моль/л.

**Результаты.** Выявлена интенсивно красная пигментация мицелия *Lentinula edodes*, обусловленная накоплением элементного селена в результате трансформации органического селенида [1] этим высшим грибом [2, 3]. Основываясь на предположении, что элементный селен образуется в результате взаимодействия его соединений с остатками эссенциальной аминокислоты L-цистеина,

предпринято квантовохимическое обоснование природы интермедиата (тиильный радикал) и региоселективности (S, S-сочетание) реакции гомолитической окислительной димеризации L-цистеина с образованием L-цистина [4]. Проведен скрининг более двадцати штаммов коллекционных культур базидиомицетов и продемонстрировано, что биодеструкция органического селенида до элементного Se происходит в погруженных культурах всех изученных грибов. Систематическое положение гриба, состав сред выращивания, величина концентрации вносимого в культуру селенорганического соединения и схема его внесения вносили вклад в различия по скорости развития окрашивания мицелия и интенсивности цвета, варьирувавшего от розового до темно-красного. Это наблюдение связано с различиями в геометрических характеристиках сформированных частиц. Показано, что полученный таким образом селен доступен для дальнейшего применения как в закрепленном на хитиновой матрице виде, так и будучи выделенным из культуральной жидкости без использования химических агентов.

С точки зрения внедрения в практику преимущества вышеописанного биогенного селена – биодоступность, пищевая и лекарственная ценность продуцентов – макробазидиомицетов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.

1. Древяко Б. И., Антипов В. А., Жуков О. И., Фоменко Л. А., Маркова Л. И., Древяко Р. И., Родионова Т. Н., Ефремов В. И., Харченко В. Г. Пат. 2051681 Российская Федерация. МПК 6 А 61 К 33/04 /. Заявл. 24.09.1993, № 93045743/15; Опубл. 10.01.1996. 12 с. Изобретения (заявки и патенты), 1996, Бюл. 1 (2), 161.
2. Tsivileva O. M., Loshchinina E. A., Pankratov A. N., Burashnikova M. M., Yurasov N. A., Bylinkina N. N., Kazarinov I. A., Nikitina V. E. *Biological Trace Element Research* 2012, 149 (1), 97-101.
3. Панкратов А. Н., Лощина Е. А., Цивилева О. М., Бурашникова М. М., Казаринов И. А., Былинкина Н. Н., Никитина В. Е. *Известия Саратовского университета* 2012, 12 (1), 11-16.
4. Панкратов А. Н., Цивилева О. М., Цымбал О. А., Белова Л. А. *Известия Саратовского университета* 2015, 15 (1), 14-23.



## PROMISING BIOMEDICAL POTENTIAL OF THE MUSHROOMS MYCELIA ENRICHED WITH SELENIUM

Tsymbal O. A.<sup>1</sup>, Tsivileva O. M.<sup>2</sup>, Pankratov A. N.<sup>1</sup>, Markin A. V.<sup>1</sup>, Atkin V. S.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>N.G. Chernyshevskii Saratov State University; <sup>2</sup>Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms of the Russian Academy of Sciences, Saratov, Russia

Mushrooms are recognized to be promising ecologically pure raw material for developing the medicinal preparations for care and prophylaxis. Of especial interest are the selenium-enriched preparations of higher-fungal origin owing to their availability, biocompatibility, and the proved biological activity. Contemporary biomedical applications of selenium are undoubtedly broad. By now, the severe decrease in toxicity of the selenium entering the organism when going from sodium selenite to elemental selenium has become evident. The approach developed in the present work allows the bioproduction of submicrostructured elemental selenium using the edible mushrooms' cultures to be put into practice.

---

## ПОИСК ШТАММОВ АКТИНОБАКТЕРИЙ, КАТАЛИЗИРУЮЩИХ ОБРАЗОВАНИЕ ИНТЕРМЕДИАТОВ СИНТЕЗА ПРОТИВОВИРУСНЫХ ВЕЩЕСТВ ИЗ ДЕГИДРОАБИЕТИНОВОЙ КИСЛОТЫ

Черемных К. М.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН; <sup>2</sup>Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

Исследована возможность использования актинобактерий из Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов для биодеструкции дегидроабиетидиновой кислоты. Отобраны штаммы, способные деградировать до 97% дегидроабиетидиновой кислоты, а также штаммы, катализирующие окисление дегидроабиетидиновой кислоты с образованием практически значимого интермедиата 15-гидроксидегидроабиетидиновой кислоты. *Rhodococcus erythropolis* ИЭГМ 267 в условиях добавления в среду культивирования 0,06 об.% н-гексадекана катализировал образование до 33% 15-гидроксидегидроабиетидиновой кислоты.

**Ключевые слова:** биотрансформация, актинобактерии, дитерпеноиды, смоляные кислоты, дегидроабиетидиновая кислота.

**Актуальность и цель работы.** Смоляные кислоты – природные трициклические дитерпеноиды, доля которых среди токсичных соединений сточных вод целлюлозно-бумажной промышленности составляет более 50%. Попадание в окружающую среду смоляных кислот крайне нежелательно, поскольку данные соединения оказывают токсичное воздействие на живые организмы и природные экосистемы. Среди смоляных кислот в жидких отходах целлюлозно-бумажной промышленности преобладает дегидроабиетидиновая кислота (ДАК) [1, 2]. Известные химические методы не позволяют осуществить полную детоксикацию ДАК. В связи с этим актуален поиск более эффективного способа нейтрализации ДАК. В настоящее время наиболее перспективно

использование микроорганизмов, способных не только снижать уровень токсичных соединений, но и трансформировать их в биологически активные вещества [3]. Одной из активно разрабатываемых в биотехнологическом плане групп микроорганизмов являются актинобактерии, которые катализируют широкий круг стерео- и региоселективных ферментативных реакций [4].

**Цель работы** – исследование возможности использования актинобактерий в качестве биокатализаторов для трансформации ДАК.

**Материалы и методы.** В работе использовали 107 штаммов актинобактерий, относящихся к *Dietzia maris* (17), *Gordonia rubripertincta* (29), *G. terrae* (11), *Rhodococcus ruber* (28), *R. erythropolis* (22) из Региональной профили-

рованной коллекции алканотрофных микроорганизмов (официальный акроним коллекции ИЭГМ, номер во Всемирной федерации коллекций культур 768, [www.iegm.ru/iegmcol](http://www.iegm.ru/iegmcol)). Actinobacteria выращивали в колбах Эрленмейера объемом 250 мл на орбитальных шейкерах (160 об/мин) при температуре 28°C. В опытах по трансформации ДАК использовали минеральную среду следующего состава (г/л):  $\text{KNO}_3$  – 1,0;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 1,0;  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$  – 1,0;  $\text{NaCl}$  – 1,0;  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,2;  $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$  – 0,02; дрожжевой экстракт – 1,0. В среду добавляли 0,1 об.% микроэлементов по Постгейту [5], 0,02–0,1 об.% n-гексадекана (C16) и 0,5 г/л ДАК, растворенной в этаноле в соотношении 1:1. ДАК вносили в минеральную среду через 48 ч роста бактериальной культуры. Продолжительность процесса трансформации составляла 7 сут.

ДАК и метаболиты экстрагировали этилацетатом. Качественный и количественный состав продуктов биотрансформации, предварительно метилированных триметилсилилдиазометаном, определяли методом тонкослойной хроматографии, а так же хромато-масс-спектрометрии с использованием хроматографа Agilent 6890N/5975B (“Agilent technology”, США).

**Результаты.** В результате проведенных исследований отобрано 8 штаммов, способных к эффективной (более 50%) биодеградации ДАК. Штаммы *D. maris* ИЭГМ 55<sup>T</sup>, *G. rubropertincta* ИЭГМ 104 и ИЭГМ 107 катализировали практически полную (до 97%) биодеструкцию ДАК. Среди исследованных культур обнаружены 4 штамма *G. rubripertincta* ИЭГМ 132, *G. rubripertincta* ИЭГМ 120, *G. rubripertincta* ИЭГМ 100 и *R. erythropolis* ИЭГМ 267 способных к трансформации ДАК с образованием от 4 до 22% соответствующего 15-гидроксипроизводного, который является перспективным интермедиатом

в синтезе противовирусных агентов [3]. Наиболее эффективное (22,5%) образование целевой 15-гидроксидегидроабетиновой кислоты наблюдается при использовании *R. erythropolis* ИЭГМ 267. Установлена зависимость образования 15-гидроксидегидроабетиновой кислоты от концентрации C16, вносимого в среду культивирования *R. erythropolis* ИЭГМ 267. При повышении концентрации C16 от 0,02 до 0,06 об.% уровень образования целевого продукта увеличивался от 11 до 33%. Дальнейшее повышение концентрации C16 в среде до 0,1 об.% приводило к снижению трансформирующей активности *R. erythropolis* ИЭГМ 267.

В результате проведенных исследований отобраны штаммы – активные биодеструкторы *D. maris* ИЭГМ 55<sup>T</sup>, *G. rubropertincta* ИЭГМ 104 и ИЭГМ 107, способные деградировать до 97% ДАК, а также штаммы *G. rubripertincta* ИЭГМ 132, *G. rubripertincta* ИЭГМ 120, *G. rubripertincta* ИЭГМ 100 и *R. erythropolis* ИЭГМ 267, катализирующие биотрансформацию дитерпенового субстрата с образованием 15-гидроксидегидроабетиновой кислоты.

Исследования выполнены в рамках государственного задания 6.1194.2014/К Минобрнауки России.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Leppanen H., Oikari A. Environ Toxicol Chem 1991, 18, 1498-1505.
2. Liss N., Bicho A., Saddler N. Can J Microbiol 1997, 75, 599-611.
3. Vorobev A.V., Grishko V.V., Ivshina I.B., Shmidt E.N., Pokrovskii L.M., Kuyukina M.S., Tolstikov G.A. Mendeleev Commun 2001, 11 (2), 72-73.
4. Catalogue of Strains of Regional Specialized Collection of Alkanotrophic Microorganisms. 2010 ([www.iegm.ru/iegmcol/strains/20.04.2015](http://www.iegm.ru/iegmcol/strains/20.04.2015)).
5. Atlas R. T. Handbook of microbiological Media. Florida: CRC Press, 1993, 1079 p.

### SEARCHING FOR ACTINOBACTERIAL STRAINS ABLE TO CATALYZE THE PRODUCTION OF INTERMEDIATES OF ANTIVIRAL COMPOUND SYNTHESIS FROM DEHYDROABIETIC ACID

Cheremnikh K. M.<sup>1,2</sup>

<sup>2</sup>Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, RAS; <sup>1</sup>Perm State University, Perm, Russia

The possibility of using actinobacterial strains from the Regional Specialized Collection of Alkanotrophic Microorganisms for effective biodegradation of dehydroabietic acid was studied. Strains capable to biodegrade more than 97% of dehydroabietic acid were selected, as well as strains catalyzing the dehydroabietic acid transformation to a biologically active 15-hydroxy derivative. *Rhodococcus erythropolis* IEGM 267 was found to catalyze the production of 15-hydroxydegidroabietic acid up to 33% in the presence of n-hexadecane (0.06%) in the culture medium.

---



---

**Авторский указатель**


---



---

**А**

Абдуллаева Л. Х.	366
Абрамова Т. Я.	368
Абрамовских О. С.	118
Абсерханова Д. У.	120
Автух А. Н.	611
Агафонова Д. Д.	217
Агафонова Е. В.	176
Агеева Е. С.	544, 546
Азизова Н. Д.	179
Акаева Ф. С.	141, 413
Акбашева О. Е.	93, 531
Аксенова В. А.	145
Албегова Д. З.	362
Алеманова Г. Д.	181
Алиева А. И.	120, 156, 184, 413
Алиева Л. О.	628
Алиева С. Ф.	156
Альтман Е. В.	6
Амантурлиева М. Е.	181
Аминева Л. Х.	82
Амирова Г. Ф.	28
Андреев Д. Н.	604
Андрюшин А. Е.	158
Аникаева М. А.	338
Аникеева О. С.	368
Анисимова Т. М.	181, 290
Антоненко С. М.	190, 196
Анциферова Ю. С.	366, 395
Аргунова Г. А.	44
Аргунова Н. А.	93, 251, 531
Арипова Т. У.	409
Арискина Е. В.	593
Арискина К. И.	611
Артамонов А. Ю.	9, 508
Архипова А. В.	99, 241
Астраух Н. В.	400
Атаев Г. Л.	160
Аткин В. С.	767
Ауходеев Д. Р.	537
Афанасьева А. А.	101
Ахатова Ф. С.	708
Ахматова Н. К.	276, 500
Ахматов Э. А.	276
Ахова А. В.	630
Ахременко Я. А.	762

**Б**

Бабаянц А. А.	190, 196
Бабушкина А. Е.	33, 753
Баева Т. А.	186, 263
Бажутин Г. А.	720
Базарный В. В.	480
Балацкая Н. В.	188
Балашова Т. С.	453
Бапаева Г. Б.	380
Барило А. А.	162
Барков С. Ю.	352
Барышева Е. С.	33, 684, 753
Батрак Н. В.	407
Батурина И. Л.	118, 428
Бахметьев Б. А.	115
Бегун Д. Н.	181
Бедулева Л. В.	338, 476, 540
Безматерных К. В.	632
Безрученко Н. В.	320, 553
Бейноева Я. С.	762
Беленюк В. Д.	67, 193, 265
Белоцерковская Е. В.	56, 62
Беляева П. Г.	606, 620
Беляева С. В.	549, 564
Беляев Д. Л.	190, 196
Березкина С. Ю.	476, 540
Берсенёва О. А.	101, 544
Бишева И. В.	167
Боев В. М.	311
Болдырева М. Н.	461, 464
Бондаренко Т. А.	691
Борзова Н. Ю.	391
Борисов А. Г.	193
Борисова О. В.	665
Борисова С. В.	417
Боровик Т. Эд	136
Бочкова М. С.	122, 147, 172
Боярских У. А.	104
Брагин Е. Ю.	582
Бровман Г. В.	125
Брындина И. Г.	333
Бубнова О. А.	551, 553, 562
Булавинцева Т. С.	446, 487
Булдакова Ю. Р.	375
Бурмистрова А. Л.	198, 556, 566
Буторин Н. Н.	546
Бушмелева Н. Н.	435

---



---

**Авторский указатель**


---



---

Бушмина О. Н.	200	Глебездина Н. С.	209
Бушуева Т. В.	136	Годовалов А. П.	211, 293
Быкова Л. П.	293	Голдобин Д. Д.	13
Быкова Т. В.	537	Головизнин М. В.	213, 375
Бынина М. П.	165	Головнева Е. С.	217
Быстрова Н. А.	200	Голоднова С. О.	215
<b>В</b>		Голощапова А. К.	217
Вайсман Я. И.	322	Голощапова Ж. А.	217
Валиева Ю. В.	270	Гольцова И. А.	387
Валиуллина А. Х.	58	Гольцов С. В.	44
Ваневская Е. А.	480, 514	Гончаренко А. В.	634
Вараксин В. В.	170	Гончаров А. Г.	84, 91, 355
Варламов В. П.	516	Горбунова А. Н.	726
Василенко А. Г.	564	Горбунова М. Н.	485
Васильева И. А.	400, 529	Горбунова О. Л.	220
Васильева О. А.	202	Гордина Е. М.	586, 628
Васильев Д. М.	722, 724	Горелова В. Г.	156
Васильев К. А.	370, 422	Горовиц Э. С.	586
Вахова Е. С.	158	Горожин П. Ю.	222
Вдовина Н. А.	129, 562	Грачев Н. И.	224
Велижинская Т. А.	176	Григорьева О. В.	686
Виноградов А. Б.	348	Гринёв В. С.	755
Виноградов С. Ю.	416	Гриценко В. А.	239
Вихорев Ю. Б.	382	Гришко В. В.	482, 720, 731
Возгомент О. В.	324	Грошев И. А.	375
Володина С. О.	632	Гулевская С. А.	746, 749
Володин В. В.	632	Гулий О. И.	728
Воляник О. В.	205	Гумерова Д. Р.	435
Ворожцова И. Н.	458	Гурская О. Г.	71, 281
Воронина А. О.	584	Гущина А. О.	224
Воронин Д. Н.	395, 431	<b>Д</b>	
Воронцов Д. М.	400	Давидович П. Б.	56, 62
Восканян Л. Р.	207, 346	Давыдова Е. В.	226
Выгодчикова Г. Ю.	127	Данилова И. Г.	417, 444, 446, 487
<b>Г</b>		Данилов Н. А.	712
Гаврилук Е. В.	11	Данченко И. Ю.	270
Газатова Н. Д.	84, 91, 355	Девальд И. В.	566
Газиева И. А.	373, 398, 424, 437, 502, 706	Дедов И. И.	461, 464
Галайко Н. В.	482	Деев А. Д.	461
Гаранина Е. Е.	58	Демаков В. А.	702
Гвоздев И. И.	67, 265	Демиденко О. И.	634
Гейн В. Л.	53	Демкин В. В.	158
Гейн О. Н.	53	Денисова Е. В.	158
Гермаш Е. И.	20	Дианова Д. Г.	129, 562
Гетте И. Ф.	417, 444, 446, 487	Дидковский Н. А.	71, 281
Гизингер О. А.	301, 402	Димитриева Т. В.	738
		Дипеш С.	338

---



---

**Авторский указатель**


---



---

Дихтяров Д. С.	537	Журавлева М. О.	448
Дмитриенко Е. В.	47	Жучков С. А.	382
Добровольская Е. И.	71	<b>З</b>	
Добрынина М. А.	239	Задорина И. И.	293
Довбня Д. В.	582	Зайнетдинова Л. Ф.	387
Догадова Л. П.	284	Зайцева И. П.	234
Долгарева С. А.	200	Зайцева Н. В.	74, 322
Долгина Е. Н.	190, 196	Зайцев Б. Д.	728
Долгих О. В.	551, 553	Закиров Р. Ш.	273
Долгушин И. И.	254, 426, 469	Заморина С. А.	385
Донецкова А. Д.	213, 375	Зачиняева А. В.	576
Донова М. В.	582, 746, 749	Зенков А. Л.	211
Дорофеева Л. В.	611, 613	Зиганшин О. Р.	402
Дремова Е. Н.	205	Зидина Н. М.	661
Дробязгин Е. А.	303	Зиновьева А. Е.	62
Дутова С. В.	15	Злакоманова О. Н.	236, 688
Дыкман Л. А.	728	Злобин А. А.	22
<b>Е</b>		Зорина А. С.	733
Евдокимов А. В.	549, 556	Зубарева А. А.	516, 738
Евстюхина Т. А.	615	Зубарева О. Е.	112
Евтушенко Л. И.	613	Зубков Д. А.	558, 738
Егорова Д. О.	604	Зуева Е. Б.	239, 387
Елманова Н. Г.	313	Зуйков И. А.	71, 281
Елькин А. А.	731	Зурочка А. В.	239, 387
Елькин В. Д.	115	Зурочка В. А.	239, 387
Емельянов В. В.	446, 487	<b>И</b>	
Еньчева Ю. А.	637	Ибрагимова Л. А.	82
Еремеева Е. А.	158, 188	Иваненкова Н. И.	391
Ермолаева Е. Н.	60, 229	Иванова Е. В.	691, 693
Ермолаева С. А.	602	Иванова И. А.	99, 241
Ермолина Е. В.	288, 311	Иванова Т. А.	382
Ерошенко Д. В.	639	Ивасик А. С.	95
Ерыгина Е. Н.	467	Ившина И. Б.	642, 751
Ешимбетова Г. З.	380	Игнатов О. В.	728
<b>Ж</b>		Измайлова Т. Д.	273
Жаркова М. С.	508	Ильинская О. Н.	609
Жаров А. В.	118	Иноятов А. Ш.	393
Жарова М. А.	71, 281	Исаева Р. И.	143, 156, 413
Железнова А. Д.	37	Исмаилова А. З.	84, 91, 355
Желтова В. И.	574	Ищенко А. М.	112
Жеребятьева О. О.	378, 574	<b>К</b>	
Жила Н. О.	758	Казанова Г. В.	281
Жиляев Е. В.	492	Калошин А. А.	490, 665
Жукова А. Е.	352	Камаева Э. Р.	28
Жулай Г. А.	231	Камышный А. М.	306, 569
Жуланова А. Д.	659	Канунникова О. М.	256
Жумадилова А.	380	Каплина Э. Н.	18

## Авторский указатель

Капрельянц Е. Ю.	467	Конон А. Д.	735
Караваева О. А.	728	Кононова И. Н.	64, 258
Караулов А. В.	49	Кононова Л. И.	659
Карганова Г. Г.	276	Конопля А. А.	24
Каримова Д. Н.	131	Конопля А. И.	13, 24, 49
Каримова Н. И.	243	Константинова О. Д.	378
Каримов И. Ф.	131, 686	Конюченко Е. А.	127
Карпенко М. Н.	112	Копейкин П. М.	508
Карпова М. Р.	15	Коренчук Ю. В.	435
Карпунина Т. И.	700	Коркотян Э.	494
Касумова А. М.	184	Кормилина Н. В.	256
Катгаходжаева М. Х.	441	Коробов В. П.	659, 661
Кашеварова Н. М.	673	Королева И. В.	382
Каширина Е. И.	245	Королев В. Г.	615
Кашникова Е. С.	193	Королевская Л. Б.	520, 533
Кенкишвили А. О.	362	Корсакова Е. С.	588, 591, 600
Килина О. Ю.	544	Коршунова И. О.	642, 740
Кинжалова С. В.	417	Костенко Е. И.	134, 261
Киргизова С. Б.	288, 378, 574	Костоломова Е. Г.	44
Кириенко А. В.	284	Котов С. Н.	127
Кирсанов А. Н.	395, 431	Коцарева О. Д.	504
Кисельков Д. М.	485	Кочина О. А.	263
Климова А. Р.	247, 324	Кошкина Е. В.	213, 375
Климова Т. А.	684	Кравченко П. Н.	231
Княжева М. А.	88	Кравченко Т. Г.	217
Ковалева Л. А.	158	Красильникова А. К.	366
Ковалева С. В.	18	Красников В. Е.	86, 95
Ковалев Д. А.	249	Краснова А. И.	51
Ковалевская-Кучерявенко Т. В.	104	Краснова Л. В.	67, 265
Ковалевская Н. П.	764	Криволапова И. М.	69, 267
Кожекина Ю. Н.	398, 437	Криворучко А. В.	740
Козлова Ю. О.	735	Кривохижина Л. В.	60, 229
Козлов И. Г.	362	Кривцов А. В.	551, 562
Козяева В. В.	606	Крошкина Н. В.	407
Колесникова А. А.	469	Кругликова С. М.	170
Колесникова Н. В.	18	Крылов А. А.	224
Колесников О. Л.	469, 710	Крынский С. А.	71, 281
Кологривова Е. Н.	93, 251, 531	Кутушева А. Э.	158
Колодкин Н. И.	9	Кудрина Е. А.	677
Колоколова А. А.	637	Кудрявцев И. В.	160, 422, 451
Коломеец А. Н.	145	Кудряшова А. В.	400, 433
Колупаев В. А.	254	Кудряшова Е. Б.	593
Кольцова Е. Н.	492	Кузенкова Л. М.	136
Комелькова М. В.	343	Кузина О. В.	343
Комиссаров В. Б.	256	Кузнецова М. В.	595, 637, 698
Кондаков С. Э.	150, 153	Кузнецов Б. Б.	606, 620
Коннова С. А.	755	Кузовкина О. З.	82

## Авторский указатель

Кузьменко Г. Н.	439	Лядова И. В.	529
Куклина Е. М.	270, 453	Ляпина А. М.	524
Куликова Е. В.	497	Ляпунов В. А.	502, 706
Куликова И. Г.	188	Ляшенко И. Э.	378, 574
Курбатова О. В.	136, 273	<b>М</b>	
Курилин В. В.	497	Мавзютова Г. А.	28, 80, 82
Куокина М. С.	263, 642, 751	Макаренкова И. Д.	500
Кшнясева С. К.	378	Макаров П. В.	158
Кылосова Т. И.	731	Максимова А. В.	595, 649
Кягова А. А.	362	Максимова Н. Е.	446, 487
<b>Л</b>		Максимов А. Ю.	598, 653, 677, 726, 744
Лазарев А. И.	13	Максимова Ю. Г.	651, 724, 726, 733
Ланин Д. В.	74, 76	Малашенкова И. К.	71, 281
Лапицкий А. В.	644	Малашенко В. В.	84, 91, 355
Лаштев О. С.	362	Мальшкіна А. И.	366, 395, 407
Лахонина Н. С.	213, 375	Мальцева А. Н.	24
Лебеденко С. А.	311	Мандра Ю. В.	480, 514
Лебединская Е. А.	500	Манонина М. Б.	546
Лебединская О. В.	276, 500	Маркелова Е. В.	86, 284
Лебедькова С. Е.	247, 324	Маркин А. В.	767
Легостаева Т. А.	320	Маркина Л. Д.	286
Лежнин Ю. Н.	279	Маркова В. А.	428, 469
Лемкина Л. М.	485, 644	Маркова Е. В.	88, 316
Леонова Е. И.	490	Мартинсон Е. А.	22
Лепехина Е. В.	646	Мартин Ш.	56, 62
Летяева О. И.	402	Мартынова Е. В.	58
Лехмус Т. Ю.	20	Мартынов А. И.	336
Лившиц Н. М.	247, 288, 324	Масленникова И. Л.	698
Литасова А. С.	653, 677	Матаева Ю. В.	205
Литвинец С. Г.	22	Матушевская Е. В.	125
Литвинова Л. С.	318, 341, 357	Махалова Г. О.	378
Литовченко А. П.	696	Мезенцева Е. А.	60, 229
Логинова Н. П.	404	Мелашенко О. Б.	84, 91, 355
Логинова О. А.	297	Мельников А. Е.	84, 91, 355
Логинова Ю. В.	428	Мельничук О. С.	273
Локтионов А. Л.	13, 200	Меньшиков И. В.	338, 476, 540
Ломтатидзе Л. В.	18	Меняйло М. Е.	84, 91, 355
Лопатина В. А.	270	Мизгина Т. О.	696
Луговская Н. П.	598, 653	Мирошкина Л. В.	136, 273
Лукина С. А.	326	Мирсалихова Н. Х.	527
Лукманова Л. З.	80	Михайлова А. С.	198
Лукьянчикова Л. В.	78, 522	Михайлова Е. А.	288, 378, 574
Лунегова И. С.	740	Михайлова И. В.	290
Лунин В. Г.	145	Михайлова Н. А.	490, 665
Лучникова В. А.	320, 553	Михайлов И. В.	419
Лысенко А. А.	558	Мишарина Л. В.	391, 400
Лысенко О. В.	78, 522		

---

**Авторский указатель**


---

Мовлонова Ш. С.	26	<b>О</b>	
Мозговая Л. А.	293	Облеухова И. А.	497
Моллаева А. М.	413	Огнева О. И.	301
Молокова М. Н.	295	Огурцов Д. П.	71, 281
Молчанова В. И.	696	Октябрьский О. Н.	632, 655, 668, 670, 675
Морозова О. С.	97	Олейник В. М.	231
Москалёв А. В.	576	Олейник Е. К.	231
Москалец О. В.	139, 456	Оленева М. А.	651, 724
Москвичева М. Г.	236	Омарова С. М.	120, 141, 143, 156, 184, 413
Мотин В. Л.	524	Орлова Е. Г.	297
Мотузова О. В.	276	Орлов Д. С.	508
Мочульская Н. Н.	446, 487	Орлов С. Б.	508
Мошев А. В.	193	Орнер И. Ю.	426
Музафарова С. А.	409	Осиков М. В.	299, 301
Музыка Н. Г.	655	Осипова И. А.	744
Мусаходжаева Д. А.	393	Островский К. А.	231
Муслимов М. О.	141	Остроушко А. А.	444
Мухамадиева Л. Р.	28	<b>П</b>	
Мухсинова Л. А.	393	Павлий С. А.	728
Мырсыкова Е. В.	504	Павлова С. И.	362
Мяделец М. А.	15	Павлова Ю. А.	598, 653
Мякишев К. И.	387	Павлов В. А.	222
<b>Н</b>		Пазина Т. Ю.	30
Нагорный С. Н.	395	Панкратов А. Н.	767
Назаров А. В.	588, 591	Пантелеев А. В.	529
Найдунова В. Г.	355	Панфилова Т. В.	37
Наумов В. З.	560	Параскун А. А.	416
Небогатилов В. О.	186	Пацула Ю. И.	145
Неделькина Н. П.	15	Пашкова Т. М.	704, 714
Незнамова Н. В.	24	Пашнина И. А.	69, 267
Некрасова И. В.	209, 453, 698	Первова О. В.	193
Непомнящих В. М.	104	Перминова И. В.	322
Нестерова И. В.	18	Перунова Н. Б.	691
Нестерова Л. Ю.	679	Пестряева Л. А.	417
Нестеров В. Ф.	411	Петерс М. А.	655
Нефедьева Ю. В.	402	Петричук С. В.	136, 273
Никитин А. В.	273	Петров А. М.	451
Никитина И. Ю.	529	Петров С. В.	419
Никольская В. В.	506	Петровская Л. Е.	125
Никольский И. С.	506	Петровский С. В.	735
Никонова М. Ф.	213, 375	Петухова А. А.	352
Никонова Т. И.	428	Пешкова Ю. И.	704
Никушкина К. В.	118, 236, 428	Пинчук А. С.	566
Новикова Т. М.	742	Пионтковская К. А.	303
Новицкий В. В.	202, 458	Пирогова Е. А.	129, 562
Ноговицина Е. М.	720		



---

**Авторский указатель**


---

Писклакова Т. П.	42, 106	Романчук А. Л.	86
Плакатина Н. В.	288	Россова Н. А.	101, 544
Плеханова М. А.	145	Рочев В. П.	129
Плешко Р. И.	93, 251, 531	Рубцова Е. В.	642
Плоткин Л. Л.	710	Румянцева М. А.	115, 700
Плотникова Е. Г.	584, 588, 622, 624	Русанова Т. С.	99, 241
Плотникова М. О.	40	Русинова Т. В.	18
Погребнова Е. И.	181	Рыбина Е. В.	286
Позднякова Н. Л.	657	Рязанцева Н. В.	458
Позюмко Э. Н.	595, 598	Рязанцев Д. Ю.	738
Полевщиков А. В.	160, 370, 422	<b>С</b>	
Полетаева М. А.	236	Саватеева Е. А.	446, 487
Полумискова Е. В.	400	Савельева А. А.	118, 426
Полюдова Т. В.	659, 661	Савина А. А.	245
Полякова С. И.	273	Савочкина А. Ю.	426
Поляниченко А. А.	762	Савченко А. А.	67, 193, 265
Попова Е. В.	95	Сайдазимов Б. Ш.	293
Попова Л. Ю.	181	Сайдакова Е. В.	535
Попов Е. А.	236	Саидова П. С.	156
Попов С. В.	22	Сальникова И. Ю.	99, 241
Поповская Е. В.	97	Самойлова З. Ю.	663
Поспелова С. В.	586, 628	Самохина И. В.	136, 273
Постовская А. М.	328	Самсонова Е. Н.	303
Пошехонцева В. Ю.	746, 749	Самусева И. В.	428
Присяжная Н. В.	593, 611, 613	Сапожников А. М.	328
Прозорова Т. М.	306	Саприна Т. В.	458
Прокопьев Д. С.	402	Саралов А. И.	606, 620
Прокопьев И. А.	762	Саранчина Ю. В.	101, 537
Прохоренко Т. С.	458	Сароянц Л. В.	560
Прохорова Е. Е.	160	Сарычева Ю. А.	37
Псарева Е. К.	165, 602	Сашенков С. Л.	254
Пулина Н. А.	51	Светлова Е. В.	158
Пустоветова М. Г.	303	Свиридов В. В.	665
Пьянкова А. А.	600, 604	Свирищевская Е. В.	125, 516
<b>Р</b>		Свитич О. А.	120, 184
Раев М. Б.	147, 165, 172, 385	Сегал М.	494
Ремезовская Н. Б.	702, 744	Селедцов В. И.	84, 91, 108, 355
Ремизова И. И.	373, 398, 411, 424, 502, 706	Семейкина П. И.	606
Репина Е. А.	461, 464	Семенихин А. А.	224
Ризванов А. А.	58	Семенова Г. Ф.	273
Рогожин Е. А.	704	Семикина Е. Л.	273
Розенштейн А. З.	150, 153	Сенникова Ю. А.	104
Розенштейн М. Ю.	150, 153	Сенников С. В.	104, 497
Романова Н. В.	467	Сервули Е. А.	328
Романов В. А.	234, 467	Серебренникова М. К.	751
Романовская Е. В.	9	Серебрякова М. К.	160, 422, 451
		Серова Т. А.	167

---

**Авторский указатель**


---

Сетко Н. П.	247, 378	Сулова Т. А.	564
Сидорова Л. П.	446, 487	Сухих А. С.	170
Сидоров А. Ю.	510	Суховой Ю. Г.	44
Сидоров Р. Ю.	673	Суходольская Г. В.	746, 749
Сидоров С. В.	497	Сходова С. А.	167
Сизенцов А. Н.	33, 684, 753	Сырвачева Д. А.	758
Силков А. Н.	104	Сычева М. В.	704, 714
Ситникова А. В.	93, 251, 531	<b>Т</b>	
Складчикова А. О.	564	Тарабрина О. В.	99, 241
Скрябина В. В.	35, 308	Тарабрина Ю. О.	469
Слепова О. С.	158, 188	Таранова А. А.	546
Слободчикова С. В.	215, 520	Тарасова Е. В.	760
Сметанина М. В.	256	Тарасова Л. А.	712, 762
Смирнова Г. В.	632, 646, 663, 668, 670, 675	Тектова А. С.	213
Смирнова Е. Н.	453	Телешева Л. Ф.	118
Смирнова М. П.	9	Тендрякова С. П.	186, 350
Смирнова О. В.	313	Терентьев А. С.	510
Смирнова С. В.	162	Терентьева С. Ю.	205
Смирнов К. В.	702	Тимашева О. А.	586
Смольникова М. В.	162	Тимганова В. П.	122, 147
Смолягин А. И.	37, 311	Тимофеева М. Р.	326
Смык А. В.	316	Тимофеев В. Т.	213, 375
Снимщикова И. А.	40, 419	Тимченко Н. Ф.	165, 602
Собянин К. А.	602, 714	Титова Н. М.	313
Сокуренок Ю. В.	609	Титова Т. Г.	735
Солдатенкова А. В.	490, 665	Ткаченко А. Г.	630, 673, 679
Сорожкина Е. С.	188	Ткачук А. П.	145
Сотникова Н. Ю.	391, 431, 433	Тодосенко Н. М.	84, 91, 108, 355
Сохоневич Н. А.	318, 341, 357	Токмакова А. С.	160
Старкова К. Г.	320, 322	Толмачева И. А.	482
Староверов С. А.	728	Топол И. А.	569
Стародумова И. П.	611, 613	Тренкеншу Р. П.	742
Староха А. В.	93, 251, 531	Тронина Т. И.	435
Старская И. С.	422	Трофимов А. Н.	112
Сташкевич Д. С.	556, 564	Трошина Е. А.	464
Степанова Е. Н.	461	Троянова Н. И.	328
Степанова О. В.	42, 106	Трусова О. Ю.	324
Столярова Е. Ю.	338	Тузанкина И. А.	514
Столяров И. Д.	451	Туманова М. С.	331
Сторожук С. В.	18	Турмова Е. П.	224
Стрюк Р. И.	213	Тюленев А. В.	668, 670
Суменко В. В.	324	Тюленева Е. А.	673
Сунцов Ю. И.	464	<b>У</b>	
Сура-Труэба С.	56, 62	Уварова А. В.	735
Суркина А. К.	755	Ульссон Б. Э.	624
Сурков А. Н.	273	Ульянова В. В.	609
		Ульянов В. Ю.	127

## Авторский указатель

Унгер И. Г.	44	Хромова Е. Б.	566
Уракова М. А.	333	Хромцова Г. А.	404
Устьянцева Л. С.	502, 706	<b>Ц</b>	
Ушаков В. Ю.	675	Цейликман В. Э.	343
<b>Ф</b>		Цейликман О. Б.	343
Фазлыева Р. М.	28	Цейтлер Т. А.	446, 487
Фархутдинова Л. М.	471, 474	Цивилева О. М.	767
Фархутдинов И. М.	471	Цигулева О. А.	207, 346
Фахруллина Г. И.	708	Цирятьева С. Б.	44
Федоров А. А.	762	Цывьян П. Б.	437
Федорова В. А.	524	Цымбал О. А.	767
Федорова Т. О.	288	<b>Ч</b>	
Федоров Д. В.	615	Чайникова И. Н.	37, 691
Федоскова Т. Г.	336	Чаша Т. В.	439
Феофанова Т. В.	167, 336	Чепасов В. И.	311
Филатенкова Т. А.	47	Черданцев Д. В.	193
Филатова Л. Б.	639	Черевко Н. А.	150, 153
Филипенко М. Л.	104	Черемных К. М.	769
Филиппова Ю. В.	37, 448	Черепанов Д. А.	299
Филиппова Ю. Ю.	198	Черешнев В. А.	69, 267, 446, 487
Фокина В. В.	746, 749	Черненко А. Ю.	615
Фомина К. В.	338	Черников О. В.	696
Фомичева Е. Е.	47	Черных А. В.	170
Фошина Е. П.	167	Четвертных В. А.	348, 404
Фрейдлин Е. В.	136, 273	Чехонацкий А. А.	127
Фролова И. С.	190, 196	Чехонацкий В. А.	127
Фролова М. В.	433	Чигвинцев В. М.	76
Фролов Б. А.	37	Чикаловец И. В.	696
<b>Х</b>		Чикинев Ю. В.	303
Хазиахматова О. Г.	318, 341, 357	Чистякова Г. Н.	373, 398, 424, 437, 502, 706
Хайбуллина С. Ф.	58	Чудаков Д. Б.	110
Хайдарова Ф. А.	409	Чудилова Г. А.	18
Хайлов Н. А.	71, 281	Чукичев А. В.	688
Хайрулина Е. А.	591	Чумаков В. Ю.	15
Хакимова Р. А.	80	Чумаков П. М.	279
Халилов М. А.	40, 419	Чумаков С. П.	279
Хантакова Ю. Н.	497	Чупахин О. Н.	446, 480, 487, 514
Хардигов А. В.	419	Чуров А. В.	231
Хлызова Л. А.	348	Чучкова Н. Н.	256
Ходус Е. А.	566	<b>Ш</b>	
Хоменков В. Г.	276	Шавшукова О. А.	348
Хонина Т. Г.	480, 514	Шайдулина Р. Р.	435
Хорошилова А. Г.	439	Шамбурова М. Ю.	735
Хохлова А. С.	284	Шамова О. В.	30
Хромова Т. В.	170, 476, 540	Шамсиев Ф. М.	243
Храмцов П. В.	122, 147, 172	Шанин С. Н.	9, 47
Христин А. А.	497		

---

**Авторский указатель**


---

Шапкина В. А.	193	Штратникова В. Ю.	582
Шаравин Д. Ю.	620, 764	Штыгашева О. В.	101, 544
Шаравьева И. Л.	350	Шульга И. А.	288
Шаропов С. Г.	393	Шульгинова А. А.	49
Шварц А. П.	112	Шумахер Г. И.	207
Швец А. С.	677	Шумкова Е. С.	622, 624
Шевцова Н. М.	93, 251, 531	Шумков М. С.	622, 673
Шевченко М. А.	328	<b>Щ</b>	
Шевченко Ю. А.	497	Щеголева Л. С.	97
Шейкин И. Ю.	712	Щелкунов М. И.	582
Шестакова Е. А.	591	Щепитова Н. Е.	714
Шестакова М. В.	461, 464	Щербик Н. В.	93, 251, 531
Шилова Н. А.	439	Щербинина Т. С.	245, 516
Шилов С. Ю.	348, 352	Щукина В. П.	628
Шилов Ю. И.	348, 352	Щуплова Е. А.	716
Шипицына Е. А.	417	<b>Ю</b>	
Широбокова М. В.	688	Юдина С. М.	99, 241
Ширшев С. В.	220, 297	Юрова К. А.	318, 341, 357
Шихабудинов А. М.	728	Юрченко А. В.	679
Шкляев Ю. В.	512	Юхнева М. А.	359
Шлепотина Н. М.	710	Юхнев В. А.	359
Шмагель К. В.	520, 533	Юшкова Т. А.	51
Шмагель Н. Г.	533, 535	<b>Я</b>	
Шманева И. А.	40	Ягудин Т. А.	125
Шмаров В. А.	84, 91, 355	Яздовский В. В.	139
Штанько И. Н.	480, 514	Янгиева Г. Б.	441
Штойко М. А.	416		