

ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

МОДИФИКАЦИЯ АНТИКОМПЛЕМЕНТАРНЫХ СВОЙСТВ IgG КАТИОНАМИ ЖЕЛЕЗА (II)

Бельтюков П.П.

Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П.Павлова, Санкт-Петербург, Россия

Взаимодействие белков с двухвалентными катионами металлов может существенно менять конформацию белковых молекул, что в свою очередь отражается на функциях белков и межбелковых взаимодействиях.

Цель данного исследования – выяснение характера изменений антикомplementарных свойств препаратов человеческого IgG в результате обработки двухвалентными катионами Fe^{2+} . В качестве основного метода определения функциональной активности системы комплемента в сыворотках крови использовали фотометрический кинетический метод регистрации гемолиза при λ -800 нм. Определены параметры общей гемолитической активности комплемента, альтернативного пути активации комплемента в присутствии ЭГТА и функциональной (гемолитической) активности C3 компонента с использованием реагента RC3, полученного путем обработки сыворотки крови монометиламином. В качестве источника комплемента использованы сыворотки крови, полученные от доноров в возрасте от 20 до 45 лет ($n=8$). Так как степень угнетения гемолиза дозозависимо меняется при изменении соотношения объемов исследованной сыворотки и IgG, вплоть до полного отсутствия угнетения при высоких концентрациях сыворотки в опыте, то при проведении эксперимента использовали такие концентрации сывороток в контрольных опытах, которые обеспечивали скорость гемолиза на уровне $\Delta E_{800}=0,020 \pm 0,050$ за 5 с при кинетической регистрации. Это позволяет зарегистрировать даже небольшие изменения активности комплемента при воздействии антикомplementарных агентов.

В эксперименте показано, что препарат IgG для лабораторного применения, приготовленный из лиофилизированного человеческого IgG (Kabi) и обладавший выраженной антикомplementарной активностью до обработки солями Fe^{2+} , почти полностью утрачивал эту активность в отношении альтернативного пути комплемента и в отношении функциональной активности C3 в системе RC3/C3 после обработки препарата раствором $FeSO_4$ (1 мМ) с последующим диализом обработанного белка в течение ночи против физиологического раствора. При этом угнетение общей (суммарной) активности комплемент-зависимого лизиса эритроцитов кролика препаратами IgG, обработанными ионами Fe^{2+} , при использовании сыворотки в конечном разведении 1:40 сохранялось. Во всех контрольных образцах, содержащих необработанный солями железа диализованный иммуноглобулин, антикомplementарная активность IgG сохранялась (табл.).

В контрольных опытах нами было показано, что ионы Fe^{2+} в максимальной концентрации 125 мкМ (при добавлении недиализованных препаратов), не оказывают прямого влияния на кинетику комплемент-зависимого лизиса эритроцитов кролика, поэтому все полученные результаты могут рассматриваться только с точки зрения модификации белка.

По нашему мнению, существуют две возможные причины, которые способны привести к изменению антикомplementарных свойств препаратов иммуноглобулина в отношении альтернативного пути в результате обработки солями железа в условиях данного эксперимента. Это, во-первых, разрушение агрегатов IgG, которые возможно присутствуют в исследованном препарате иммуноглобулина и, во-вторых, нарушение третичной структуры белка, ведущее к снижению сродства IgG к насцентному C3b, который является компонентом, необходимым для процесса амплификации в ходе активации комплемента по альтернативному пути.

ТАБЛИЦА. МОДИФИКАЦИЯ АНТИКОМПЛЕМЕНТАРНЫХ СВОЙСТВ IgG КАТИОНАМИ Fe^{2+}

Исследованные препараты	Изменения скорости гемолиза эритроцитов кролика (в %% к контролю)			
	Общая активность комплемента	Альтернативный путь		Функциональная активность C3
		V1	V2	
IgG (37,5 мкг/мл)	$50,4 \pm 18,9$	$63,4 \pm 9,8$	$71,1 \pm 8,9$	$48,5 \pm 12,1$
IgG (37,5 мкг/мл) обработанный Fe^{2+}	$52,8 \pm 16,3$	$95,1 \pm 11,2^*$	$86,5 \pm 13,8$	$97,8 \pm 14,6^*$

Примечание: звездочками помечены достоверные отличия между опытами, проведенными с обработанным и необработанным ионами Fe^{2+} IgG ($p < 0,05$).

ПЕРФОРИН-ОПОСРЕДОВАННАЯ ЦИТОТОКСИЧНОСТЬ ЛИМФОЦИТОВ**Борунова А.А., Чкадуа Г.З., Заботина Т.Н., Арустамян Л.Ю.***ГУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва.*

Активность НК клеток, традиционно определяемая в цитотоксическом тесте радиоизотопным (Cr^{51}) и колориметрическим (МТТ, ЛДГ) методами, является перфорин-опосредованной. Перфорин – белок, способный проникать в мембрану клетки-мишени и, в результате полимеризации, образовывать мембраноатакующий комплекс, вызывая лизис клетки-мишени.

Целью данной работы было сопоставить результаты колориметрического метода оценки цитотоксической активности НК клеток и результаты цитофлюориметрического метода определения уровня экспрессии перфорина в CD16 популяции.

Были исследованы мононуклеары периферической крови доноров ($n=13$). Для определения цитотоксической активности НК клеток использовали коммерческую тест-систему CytoTox 96 (Promega, США), где цитотоксичность оценивали по уровню свободной лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в соотношениях эффектор:мишень 40:1, 20:1, 10:1 и 5:1, соответственно. Лимфоциты периферической крови исследовали с использованием моноклональных антител фирмы «Becton Dickinson» к CD16 антигену, изотипических контрольных сывороток и антител для внутриклеточного окрашивания перфорина. Двухцветный анализ НК клеток проводили на проточном цитофлюориметре FACScan («Becton Dickinson», San Jose, США) с программным обеспечением Lysis II.

При исследовании CD16⁺перфорин⁺ клеток, было выявлено, что донорская группа подразделяется на две подгруппы – с высокой и низкой экспрессией перфорина. Количество перфорин позитивных НК клеток в первой группе колебалось от 25 до 32%, составляя в среднем $28,5 \pm 2,8\%$, а во второй – от 6 до 13%, составляя в среднем $10,5 \pm 3\%$. В одном случае уровень CD16⁺ перфорин⁺ лимфоцитов составил 2%, при этом цитотоксическая активность не зависела от соотношения эффектор:мишень и не превышала 1% (данные этого донора из анализа исключены). Активность НК клеток в цитотоксическом тесте в двух группах также различалась (данные представлены в таблице).

И в первой и во второй группе сохранялась одинаковая закономерность: чем выше содержание CD16⁺перфорин⁺ лимфоцитов, тем выше цитотоксическая активность. И напротив, чем меньшее количество перфорин позитивных CD16⁺ клеток, тем ниже цитотоксическая активность.

Таким образом, функциональная активность НК клеток находится в прямо пропорциональной зависимости от уровня экспрессии перфорина в CD16 лимфоцитах.

ИММУНОЦИТОХИМИЧЕСКАЯ ВЕРИФИКАЦИЯ ЭКСПРЕССИИ ГОРМОНОВ В ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫХ КЛЕТКАХ**Кветной И.М., Полякова В.О.***ГУ НИИ акушерства и гинекологии им. Д.О. Отта РАМН, Санкт-Петербург, Россия*

Введение. В последние два десятилетия появляется все больше данных о том, что идентичные пептидные гормоны и биогенные амины синтезируются нервными, иммунными и эндокринными клетками. Такая общность химических механизмов трех регуляторных систем организма – нервной, эндокринной и иммунной стимулировала бурное развитие исследований в новой области знаний, названной нейроиммуноэндокринологией. Однако, лишь отдельные исследования посвящены верификации конкретных гормонов в лимфоцитах, в то время как другие типы иммунокомпетентных клеток в этом плане детально не изучены.

Цель работы. Иммуноцитохимическое изучение экспрессии биогенных аминов и регуляторных пептидов в различных иммунокомпетентных клетках.

Материал и методы. Объектом исследования явились тимоциты и эпителиальные клетки тимуса, тучные клетки, естественные киллеры и эозинофильные лейкоциты человека. Тимоциты выделяли из фрагментов тимуса абортных эмбрионов на 20-недельном сроке развития. После соответствующих процедур разделения тимоцитов на субпопуляции CD4⁺ или CD8⁺ экспрессию мембранных молекул для их идентификации определяли методом проточной цитофлуориметрии на проточном цитометре FACSCalibur (Becton Dickinson). В качестве тимусных эпителиальных клеток (ТЭК) использовали клетки суспензионной линии VTEC2.H/S, ранее полученные путем трансформации ТЭК эмбрионального тимуса человека вирусом SV40 и последующего клонирования трансформированных клеток. Естественные киллеры (НК-киллеры) выделяли из селезенки доноров центрифугированием в градиенте Ficoll-Paque. Тучные клетки и эозинофильные лейкоциты изучали на гастробиоптатах в слизистой оболочке и подслизистом слое желудка. Иммуноцитохимические исследования проводили с использованием антител к различным гормонам.

Результаты. В различных субпопуляциях тимоцитов человека, находящихся на различной стадии дифференцировки, обнаружена экспрессия следующих гормонов: в предшественниках Т-лимфоцитов (CD4⁺CD8⁻) содержатся серотонин и мелатонин; в незрелых кортикальных клетках (CD4⁺CD8⁺) обнаружен только серотонин, в зрелых медуллярных клетках (CD4⁺CD8⁻) выявлен серотонин, мелатонин, бета-эндорфин и гистамин. В ТЭК, формирующих тельца Гассала обнаружена экспрессия серотонина, соматостатина и гастрин. В тучных клетках ве-

ТАБЛИЦА. ЦИТОТОКСИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ НК КЛЕТОК (%)

Эффектор: мишень	1 группа (n=6)			2 группа (n=6)		
	Минимальное значение	Максимальное значение	Среднее значение	Минимальное значение	Максимальное значение	Среднее значение
40:1	43	48	$45,5 \pm 2,3$	13	30	$21,5 \pm 6,3$
20:1	20	35	$28 \pm 6,5$	7	18	$11,8 \pm 4$
10:1	12	25	$18,6 \pm 5,4$	4	10	$6,6 \pm 2$
5:1	7	18	$12,5 \pm 4,6$	2	8	$4,1 \pm 2,1$

рифицирована экспрессия серотонина, мелатонина, гистамина, вазоактивного интестинального пептида. Положительная иммунореактивность к мелатонину, серотонину, инсулину, соматостатину и бета-эндорфину зарегистрирована в естественных киллерах. Эозинофильные лейкоциты секретируют серотонин и мелатонин.

Заключение. Выявленная экспрессия гормонов в иммунокомпетентных клетках отражает важную роль присутствующей им гормональной функции в обеспечении молекулярной сигнальной регуляции физиологических процессов в живом организме.

КАЧЕСТВЕННЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ АНТИТОКСИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ В ОЦЕНКЕ ПРОТИВОДИФТЕРИЙНОГО ИММУНИТЕТА

Краева Л.А., Носков Ф.С., Ценева Г.Я.

Санкт-Петербургский НИИЭМ им. Пастера, Россия

В создании устойчивого иммунитета к инфекционным заболеваниям важное место занимает не только количество антител, вырабатываемых в результате вакцинации, но и их качество. Этот показатель во многом определяется прочностью и устойчивостью образованного комплекса «антиген-антитело» (авидностью).

Считается, что низкоавидные антитела не могут защищать человека от заболевания в случае инфицирования. Так, при вирусном гепатите изучены периоды заболевания с позиций соотношения низко- и высокоавидных антител в крови инфицированного человека (Мукомолова А.Л., 2004) и показана прямая связь уровней авидности антител с периодом заболевания.

Известно, что в период прошедшей эпидемии дифтерии, а также на ее спаде регистрировались заболевания среди привитых людей, содержащих антитоксические антитела в титрах 1:40-1:80 (в реакции пассивной гемагглютинации), хотя этот уровень принят в качестве обеспечивающего невосприимчивость к инфекции (Рыкушин Ю.П., 1995; Ценева Г.Я., 1997).

Цель исследования: изучение количественно-качественных показателей противодифтерийных антител в крови привитых взрослых и их значение в обеспечении защиты от инфекции.

Материалы и методы. Были исследованы сыворотки крови 350 взрослых лиц из Северо-Западного Округа РФ, которые были объединены в несколько групп:

- больные разными формами дифтерии (до введения противодифтерийной сыворотки);
- носители *C.diphtheriae*;
- лица, контактные по дифтерии;
- здоровые лица различных профессиональных групп, обследованные с профилактической целью;
- больные, страдающие другой инфекционной патологией (туберкулез, гепатит В, гепатит С и др.).

Количественное содержание антитоксических противодифтерийных антител и их авидность определяли в параллельных исследованиях методом иммуноферментного анализа (ИФА) с помощью тест-системы производства НПО «Биомед» г. Пермь. Для изучения прочности связывания антител с антигеном в качестве вещества, ослабляющего связи между компонентами образовавшегося комплекса, был выбран раствор мочевины. Экспериментальным путем подобрана оптимальная ее концентрация (8 М раствор). Сыворотки расценивали как высокоавидные, если индекс авидности антител в них был более 50%.

Результаты. Данные проведенных исследований показали, что у части больных дифтерией различными формами, а также у привитых против дифтерии в 77% случаев выявлялись преимущественно низкоавидные антитела. Они также доминировали в крови больных острой инфекционной патологией верхних дыхательных путей и носителей *C.diphtheriae*. Между тем, у 85% из числа перечисленных категорий обследованных концентрация антитоксических антител определялась на уровне 0,1-1,0 МЕ/мл, что соответствует содержанию антител, обеспечивающему защиту от инфекции.

При оценке возрастной характеристики лиц, у которых определяли авидность антитоксических антител, наблюдали достоверное снижение уровня высокоавидных антител среди лиц старше 45 лет. Как известно, именно среди лиц старше 50 лет в последние годы чаще регистрировались заболевания дифтерией, в том числе среди привитых.

Таким образом, полученные нами предварительные результаты о качественном содержании противодифтерийных антител у различных групп обследуемых меняют наше представление о значении количественно-качественного уровня антител в защите от инфекции.

МЕТОДЫ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ С-РЕАКТИВНОГО БЕЛКА (СРБ) НА ОСНОВЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ (МКАТ)

Крутецкая И.Ю., Терехина Л.А., Широкова В.Н., Климович В.Б.

Центральный научно-исследовательский рентгенорадиологический институт МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия

Повышение уровня СРБ в крови служит показателем активности воспалительных процессов при инфекциях, травмах, после хирургических вмешательств. Исследованиями последних лет доказана прогностическая значимость уровня СРБ при сердечно-сосудистых заболеваниях. Наблюдение за уровнем СРБ у пациентов группы риска позволяет оценить вероятность тяжелых поражений миокарда. Для выполнения подобных исследований необходимы высокочувствительные и точные приемы анализа. Более всего отвечают этим требованиям тесты на основе моноклональных антител.

Целью настоящей работы было получение МКАТ против СРБ и разработка на их основе методов количественного определения этого белка.

В результате гибридизации и отбора было получено 16 стабильных клонов гибридом, продуцирующих МКАТ против СРБ человека. Активность и специфичность МКАТ оценивали с помощью твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА). Для подтверждения специфичности МКАТ использовали препараты, полученные независимо в нескольких лабораториях: рекомбинантный СРБ фирмы «Calbiochem», полимерную и мономерную формы СРБ, выделенного из сыворотки крови больных с ревматоидным артритом, а также препарат сывороточного амилоида Р (SAP). Все МКАТ связывали СРБ разного происхождения и не взаимодействовали с препаратом SAP. Четыре МКАТ взаимодействовали только с эпитопами мономерного или пентамерного СРБ, возникающими при его адсорбции на поверхности пластика. Двенадцать МКАТ взаимодействовали как с иммобилизованным на твердой фазе, так и с нативным СРБ. Связывание всех МКАТ с нативным антиге-

ном происходило независимо от присутствия ионов Ca^{2+} . Отсутствие влияния ионов Ca^{2+} на взаимодействие МКАТ с СРБ позволяет использовать в качестве исследуемого материала, как сыворотку крови, так и плазму. Установлено, что после адсорбции на твердой фазе, МКАТ сохраняли специфичность и антиген-связывающую активность. С помощью метода конкурентного ингибирования установлено, что полученные МКАТ распознают не менее 4 разных эпитопов на молекуле СРБ. Подобраны сочетания меченых и адсорбированных на твердой фазе МКАТ. На их основе разработан двухдетерминантный метод количественного определения СРБ. Продолжительность такого исследования составляет 3 часа, а чувствительность метода – 0,9 нг/мл. Этот тест может быть ориентирован на обследование лиц с низким содержанием СРБ (детей и взрослых доноров). В основе второго теста лежит метод конкурентного ингибирования: СРБ из исследуемого образца конкурирует с меченым пероксидазой СРБ за связывание с МКАТ, адсорбированным на твердой фазе. Тест одностадийный и продолжительность исследования составляет 45-60 минут. Предел чувствительности данного теста составляет 90 нг/мл. Преимущества этого метода могут быть использованы при обследовании пациентов с патологиями или групп риска, когда уровень СРБ значительно повышен. С помощью двух разработанных тестов была определена концентрация СРБ в группе здоровых доноров. Полученные значения концентраций СРБ совпадают и лежат в пределах признанных границ нормы.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ С ПОМОЩЬЮ ЦИТОЛИТИЧЕСКИХ ЛИМФОЦИТОВ ПРОИСХОЖДЕНИЯ КЛОНОГЕННЫХ СТРОМАЛЬНЫХ ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ В СМЕШАННЫХ ПОПУЛЯЦИЯХ КОСТНОМЗГОВЫХ КЛЕТОК

Лациник Н.В.

*ГУ НИИ эпидемиологии и микробиологии
им. Н.Ф.Гамалеи РАМН, Москва, Россия*

Данные о происхождении стволовых стромальных клеток костного мозга в смешанных популяциях имеют решающее значение для оценки их дифференцировочного потенциала и способности к самоподдержанию при различных видах заместительной терапии. Известно, что при в/в трансплантации костного мозга высокооблученным реципиентам кроветворные клетки последних имеют донорское происхождение; напротив, при гетеротопной трансплантации фрагмента костного мозга кроветворные клетки постепенно замещаются клетками реципиента.

Целью настоящего исследования было выяснение происхождения стволовых стромальных клеток в таких смешанных популяциях. В ранее выполненных работах использовали либо иммунофлюоресцентный метод, либо хромосомный маркер. Оба метода имеют существенные недостатки: в первом случае фибробласты окрашиваются чрезвычайно слабо, а при использовании хромосомного маркера практически невозможно идентифицировать содержащую его делящуюся клетку.

Мы предложили использовать лизис стромальных колоний цитолитическими лимфоцитами, иммунными к одному из гаплотипов, по которым различаются костномозговые клетки в культурах смешанных популяций. С этой целью использовали цитолитические лимфоциты, полученные иммунизацией *in vivo* (1) и *in vitro* (2). В обоих случаях это были лимфоциты мышей СВА(Н2^b), иммунизи-

рованные против клеток С57В1/6(Н2^b). В 1 случае – это были лимфоциты перитонеального экссудата (освобожденного от макрофагов карбонильным железом) мышей, иммунизированных клетками лейкоза EL-4; во 2 – клетки из односторонней смешанной культуры клеток селезенки. Для обработки цитолитическими лимфоцитами в качестве модели использовали 8-дн. культуры семисингенных смесей клеток костного мозга мышей СВА и F1 (СВАхС57В1). Культивировали по 10^6 клеток СВА или F1, либо 2×10^6 смеси клеток 1:1. В относительно ранних 8-дн. культурах часть стромальных колоний содержит менее 50 фибробластов, которые могут подвергаться аутокиллингу. Поэтому учитывали лизис колоний, отмеченных под инвертированным микроскопом, содержащих более 100 фибробластов. В матрасы Т 25 эксплантировали такое количество клеток, чтобы выросло около 100 колоний стромальных фибробластов. На 8 день в матрас помещали по $3-5 \times 10^6$ иммунных лимфоцитов и через 24-40 часов культуры фиксировали, окрашивали и подсчитывали число и процент лизированных окрашенных колоний.

В культурах клеточных смесей процент лизированных колоний практически совпадал с ожидаемым, который рассчитывали, исходя из эффективности клонирования каждого из компонентов смеси (среди отмеченных 471 колонии в смешанных культурах при ожидаемом лизисе $65 \pm 10\%$ колоний – лизировались $62 \pm 9\%$ колоний). В контрольных культурах СВА- лизировано 0% из 111 отмеченных колоний; в культурах F1- лизировались 100% из 195 отмеченных колоний. В культурах костного мозга семисингенных радиационных химер (доноры – F1, облученные реципиенты – СВА), восстановленных 4×10^7 донорских клеток (содержавших, судя по эффективности клонирования, 3200 стромальных предшественников), и имевших срок химеризма от 31 до 45 дней из 224 отмеченных колоний 1- была лизирована полностью и 7 – частично ($\Sigma 3\%$), что совпало с величиной аутокиллинга в контрольных культурах костного мозга облученных СВА. В контрольных культурах костного мозга F1 все 113 отмеченных колоний были лизированы. В культурах костного мозга химер 2-й группы (облученные реципиенты – F1, доноры – СВА) из 126 отмеченных колоний киллеры лизировали 100% колоний. Полученные данные свидетельствуют о реципиентской принадлежности стволовых стромальных клеток костного мозга радиационных химер при полной замене кроветворных клеток на донорские (судя по цитотоксическому индексу с антилинейной сывороткой). Предложенный метод позволил проанализировать происхождение популяции стволовых стромальных предшественников костного мозга в смешанной популяции.

ИССЛЕДОВАНИЕ ФАКТОРОВ ЕСТЕСТВЕННОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ У БОЛЬНЫХ ПРИ РАЗЛИЧНОЙ ПАТОЛОГИИ

**Марченко Л.А., Ракитина Е.Л., Титаренко А.И.,
Первушин Ю.В.**

*Краевой клинический диагностический центр,
Ставропольская государственная медицинская
академия, Ставрополь, Россия*

Изменение активности и функциональных резервов нейтрофильных гранулоцитов (НГ) отражают защитные и адаптационные возможности организма при инфекционном процессе. НГ реагируют на малейшие изменения постоянства внутренней среды, определяют устойчивость

организма к бактериям, вирусам и простейшим, а также играют важную роль в развитии адаптивных процессов при развитии хронических заболеваний различной этиологии.

Целью настоящей работы явилось изучение факторов естественной резистентности организма, включающих фагоцитарную и функциональную активность НГ, а также определения миелопероксидазной активности (МПО) и содержания лизосомальных катионных белков (ЛКБ) у детей и взрослых, страдающих различными заболеваниями.

Материалы и методы. Обследовано 150 пациентов обоего пола, из них 30 детей в возрасте от 1 года до 14 лет. Группу детей составляли часто болеющие дети (более 6 раз в год) – 30 человек. Взрослые – от 18 до 70 лет по 30 человек в группе распределены по заболеваниям: частые острые респираторные вирусные инфекции (ОРВИ) – более 4 раз в год, рецидивирующий герпес (РГ), рецидивирующий фурункулез (РФ). Контрольную группу составляли 30 практически здоровых людей. Показатели неспецифической резистентности организма определяли у всех обследуемых. Для изучения поглотительной активности клеток периферической крови человека использовали тест, основанный на регистрации поглощения объектов фагоцитоза. Проводилась оценка фагоцитарной активности для суммы всех типов фагоцитирующих клеток. В качестве объекта фагоцитоза использовали тщательно отмытые пекарские дрожжи. Реакцию проводили при оптимальной концентрации дрожжей (10×8 клеток в мл). Приготовленные мазки для подсчета фагоцитоза фиксировали метанолом и окрашивали по Романовскому-Гимза. Подсчет проводили в 200 клетках, потенциально способных к фагоцитозу – нейтрофилов, моноцитов и эозинофилов. В основе реакции НСТ-теста лежит восстановление в цитоплазме нейтрофилов нитросинего тетразолия до диформаза под влиянием супероксидного аниона. Мазки фиксировали метанолом и окрашивали азуром-2. Подсчет проводили в 200 нейтрофилах крови. Резервную активность нейтрофилов учитывали после активации их пирогеналом. При определении ЛКБ мазок крови фиксировали 5% сульфосалициловой кислотой, окраску проводили 0,1% раствором бромфенолового синего, ядра докрашивали 1% раствором сафранина. Лизосомально-катионный тест оценивали, рассчитывая средний цитохимический коэффициент (СЦК) по формуле, предложенной В.Е. Пигаревским. При изучении уровня МПО мазки крови фиксировали в спирт-формалиновом реактиве. В качестве субстрата использовали бензидин. Содержание МПО в НГ определяли полуколичественным методом.

Основные результаты. В контрольной группе фагоцитарная активность нейтрофилов составила $76,3 \pm 3,76\%$, фагоцитоз стимулированный – $89,1 \pm 4,57\%$; НСТ-теста $6,98 \pm 1,30\%$, НСТ-индуцированный $19,3 \pm 1,78\%$, резервная активность нейтрофилов по данным НСТ-теста была равна значению $3,15 \pm 0,24$; коэффициент МПО составил $1,96 \pm 0,04$, уровень ЛКБ – $1,57 \pm 0,03$.

Фагоцитарная активность у обследуемых групп пациентов оставалась в пределах нормы. Только у больных с РГ и РФ были несколько ниже нормы и составила по сравнению с контрольной группой $68,89 \pm 3,37$ и $69,57 \pm 3,47\%$ соответственно.

Для оценки функционального состояния гранулоцитов были изучены наиболее важные показатели микробицидной системы: НСТ-тест, НСТ-индуцированный, резервная активность нейтрофилов. Статистически достоверная разница в НСТ-тесте отмечается у пациентов в группах с РГ и РФ – $2,83 \pm 0,31$ и $16,83 \pm 2,75\%$ ($p < 0,01$). Согласно литера-

турным данным, способность стимулированных бактериальным липополисахаридом нейтрофилов генерировать активные формы кислорода (по восстановлению нитросинего тетразолия) снижается в пожилом возрасте, но при постановке спонтанного НСТ-теста ее изменения не выявляются. Эти же тенденции наблюдаются и в группе ЧБД при сравнении с пациентами, у которых отмечаются ОРВИ. По данным НСТ-спонтанного теста этот показатель составил у детей $7,40 \pm 1,23\%$ и у взрослых $5,50 \pm 1,13\%$. При изучении резервной возможности нейтрофилов (стимуляция пирогеналом *in vitro*) у детей этот показатель индуцированного НСТ-теста составил $23,21 \pm 3,20\%$, а у взрослых – только $8,00 \pm 1,01\%$ ($p < 0,01$).

Цитохимические исследования статистически достоверной разницы между изучаемыми группами пациентов не выявили. По сравнению с контрольными группами отмечается повышение МПО у ЧБД $2,17 \pm 0,05$ и в группе взрослых с ОРВИ заболеваниями $2,16 \pm 0,06$. Несколько ниже значение МПО отмечалось у пациентов с РГ и РФ $2,08 \pm 0,07$ и $2,06 \pm 0,04$. При исследовании ЛКБ у больных с РГ и РФ этот показатель по сравнению с контролем изменился незначительно и составил $1,66 \pm 0,05$ и $1,64 \pm 0,04$. Несколько выше эти значения были в группах ЧБД и ОРВИ: $1,72 \pm 0,03$; $1,70 \pm 0,06$.

Заключение. Несмотря на повышение уровня ЛКБ и МПО при ОРВИ у взрослых статистически достоверной разницы между этими показателями у практически здоровых людей и обследуемых групп пациентов не выявлено. Это объясняется тем, что наиболее существенные изменения ЛКБ и МПО отмечаются в период разгара заболевания. Мы же обследовали пациентов в стадии ремиссии, когда клинические симптомы заболевания отсутствовали. Снижение фагоцитарной активности нейтрофилов было только у пациентов с РГ и РФ, у лиц с другими заболеваниями этот показатель оставался в пределах нормы. Для более детального изучения фагоцитоза необходимы исследования основных стадий этого процесса: миграции, хемотаксиса, адгезии, агрегации, а также различных продуктов секреции нейтрофилов и, в первую очередь, интерлейкинов.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОЛИФЕРАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ ОПУХОЛЕВЫХ ПЛАЗМОЦИТОВ *IN VITRO* ДЛЯ ОЦЕНКИ ИХ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К ЦИТОСТАТИЧЕСКИМ ПРЕПАРАТАМ

Мыслицкий В.Ф., Космачева С.М., Цвирко Д.Г.

ГУ РНПЦ гематологии и трансфузиологии, Минск, Беларусь

Существенным препятствием эффективного использования стандартных протоколов химиотерапии больных лейкозом является нередко определяемая первичная химиорезистентность опухолевых клеток к применяемым препаратам и активация механизмов множественной лекарственной устойчивости. Поиск наиболее оптимального метода тестирования индивидуальной чувствительности или устойчивости опухолевых клеток данного конкретного больного к тем или иным химиопрепаратам является актуальной задачей клинической гематологии.

Цель данной работы – подбор эффективного метода тестирования чувствительности опухолевых плазмочитов больных множественной миеломой *in vitro* к панели цитостатических химиопрепаратов и сравнительный анализ результатов тестирования химиочувствительности *in vitro* с результатами лечения *in vivo*.

Химиочувствительность опухолевых плазмочитов *in vitro* определяли по их жизнеспособности в МТТ, DiSC и пролиферативных тестах (по включению ³Н тимидина в культивируемые клетки).

Установлена прямая корреляционная зависимость между результатами, полученными вышеперечисленными методами. Наиболее высокие индексы корреляции обнаружены между результатами, полученными в пролиферативном и DiSC-тестах. Достоверность результатов, полученных в МТТ-тесте снижалась по мере снижения процентного содержания опухолевых плазмочитов и была равна нулю при концентрации опухолевых клеток менее 60% в исследуемом образце. Напротив, уровень спонтанной пролиферативной активности и достоверность результатов, полученных в пролиферативном тесте мало зависели от процентного содержания опухолевых плазмочитов в исследуемом образце, а в значительной мере определялись процентным содержанием последних находящихся в S – фазе.

Для прогнозирования комплексного влияния препаратов *in vivo* нами разработана балльная оценка химиочувствительности *in vitro*. Сравнение результатов определения химиочувствительности опухолевых плазмочитов к панели цитостатических препаратов *in vitro* с результатами лечения больных при использовании балльной оценки химиочувствительности показало их полное совпадение в пролиферативном тесте, в DiSC методе – на 63%, а в МТТ-методе – на 43%.

Наши результаты свидетельствовали, что метод оценки химиочувствительности опухолевых плазмочитов по подавлению их жизнеспособности *in vitro*, определяемой в пролиферативном тесте позволяет максимально точно прогнозировать результаты химиотерапии больных ММ.

КРИОГЛОБУЛИНЕМИЯ И АУТОАНТИТЕЛА КАК МАРКЕРЫ АУТОИММУННОГО ОТВЕТА У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ГЕПАТИТОМ С (ХГС)

Неустроева Ю.А., Тихомирова Т.А.,
Дунаева Н.В., Лапин С.В., Тотолян Арег А.

НМИЦ МЗ и СР РФ по молекулярной медицине
СПбГМУ им. акад. И. П. Павлова

Введение. У больных ХГС, наряду с поражением печени, наблюдается развитие аутоиммунных заболеваний, таких как эссенциальная криоглобулинемия (КГ), мембранозно-пролиферативный гломерулонефрит.

Целью нашего исследования явилось определение встречаемости и клинико-диагностической значимости выявления КГ и аутоантител у больных ХГС.

Материалы и методы: Нами было обследовано 115 больных ХГС, из них – 46 мужчин и 69 женщин в возрасте от 17 до 69 лет. Средний возраст составил 38,6±12 лет. В качестве группы контроля были использованы сыворотки 20 здоровых доноров, возраст и половой состав которых совпадал с таковым в исследуемой группе.

КГ диагностировались визуальным методом с полуколичественной оценкой полученного результата. Сыворотки пациентов в исследуемых группах были обследованы на наличие ревматоидного фактора (РФ) методом агглютинации частиц латекса (РАО «БИОПРЕПАРАТ», СПбНИИВС).

Из 115 больных ХГС, 60 больных, равных с исходной группой больных по половому составу и возрасту, были обследованы на наличие аутоантител. Нами определялись антинуклеарный фактор (АНФ), антигладкомышечные антитела (АГМА), антимитохондриальные

антитела (АМА). Аутоантитела выявлялись с помощью метода непрямой иммунофлюоресценции. Специфическое свечение оценивалось с помощью флуоресцентного микроскопа Axiostar 40 фирмы Zeiss (Австрия).

Результаты. КГ была выявлена у 46 из 115 (40%) пациентов, среди которых 70% составляли женщины. КГ наблюдалась у 71,4% (15/21) больных с цирротической стадией ХГС, в 82% (9/11) случаев среди больных с геморрагическим васкулитом. У 85,7% (6/7) больных с триадой Мельтцера (пурпура, артралгии, слабость) также обнаруживались КГ. РФ достоверно чаще встречался в группе больных с наличием КГ, нежели в той, у которой КГ выявлены не были (51% (25/46) против 11% (8/69) соответственно, против $p<0,05$).

Антитела были выявлены у 13 из 60 (21,6%) больных, среди которых АНФ был обнаружен у 7/60 (11,7%) больных. АГМА определялись у 6/60 (10%) больных. Выявление АНФ и АГМА совместно отмечалось в 2,4% случаев, АМА – в 1,7%. Все антитела выявлялись преимущественно у женщин (93,3%), причем АНФ встречался исключительно у лиц женского пола. В 69,2% (9/13) случаев отмечалось совместное обнаружение антител и КГ. При выявлении АГМА достоверно чаще наблюдалась цирротическая стадия гепатита С нежели в группе больных, у которых данные антитела обнаружены не были (66,7% (4/6) и 21,2% (10/47) соответственно, $p<0,05$).

В группе контроля аутоантитела, КГ и РФ выявлены не были.

Выводы. У больных с хроническим гепатитом С наблюдается высокая встречаемость аутоантител и КГ, преимущественно, при цирротической стадии гепатита С. Факт о достоверно более частом выявлении РФ у больных с КГ свидетельствует о том, что у больных ХГС преобладают КГ смешанного типа, появление которых характерно для гепатита С.

Помимо этого, при обнаружении КГ и АГМА отмечается преимущественно у больных ХГС не только с наличием цирротической стадии гепатита, но также и с его внепеченочными проявлениями, такими как геморрагический васкулит и триада Мельтцера.

СОДЕРЖАНИЕ АНТИТЕЛ К АНТИГЕНАМ УСЛОВНО-ПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ В ПРЕПАРАТАХ ВНУТРИВЕННЫХ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ

Орлова М.Л., Мигунов В.Н., Орлова Г.К.,
Санков М.Н., Седова А.А., Дергунова Н.Н.

Гематологический Научный Центр РАМН;
НПЦ «Медицинская иммунология» МЗ РФ,
Москва, Россия

Современные требования фармакопейных статей к препаратам внутривенных иммуноглобулинов (ВВИГ) обращают внимание производителей на необходимость контроля концентрирования антибактериальных и противовирусных антител. I. Knezevic-Maramica (2003 г.) считает целесообразным учитывать антитела к антигенам двух разных бактерий.

В задачу исследования входило: оценить эффективность контроля антител к 7 видам условно-патогенных бактерий (УПБ) с помощью тест-системы УПБ-РАЛ (НПЦ «Медицинская иммунология»), разрешенной к использованию ГИСК им. Л. А. Тарасевича в 2003 г.

На первом этапе была проведена оценка содержания антител в плазме крови доноров, поступающей на произ-

ТАБЛИЦА. СОДЕРЖАНИЕ АНТИТЕЛ К АНТИГЕНАМ УПБ

Наименование исследованных образцов	Содержание антител к антигенам УПБ (1/Т)				
	<i>Pseud. aerug.</i>	<i>E. coli</i>	<i>Prot. mirab.</i>	<i>Klebs. pneum.</i>	<i>Staph. aureus</i>
Плазма крови доноров	168	215	198	260	556
Иммуноглобулин нормальный человека (по данным контрольной лаборатории ИмБиО)	-	8-32	-	-	-
Иммуноглобулин нормальный человека (УПБ-РАЛ)	32	64	8	256	2048
Пентаглобин (Biotest)	1280	1280	64	1280	320
Пентаглобин (УПБ-РАЛ)	512	256	128	1024	256
Октагам (Biotest)	160	80	8	80	10
Октагам (УПБ-РАЛ)	256	256	32	512	4096

водство ВВИГ в Нижегородское предприятие ИмБиО и в изготовленных сериях Иммуноглобулина нормального человека для внутривенного введения (см. табл.).

Сравнительный анализ данных выявил существенное снижение содержания антител к антигенам УПБ (*Ps. aeruginosa*, *E. coli*, *Pr. mirabilis*), что подтверждается данными производителя (активность антител к *E. coli*). По нашим данным не произошло концентрирование антител к антигенам клеточной стенки *Kl. pneumoniae*. Отмечено также 3-5-кратное увеличение титра антител к *S. aureus*.

На втором этапе работы нами была проведена сравнительная оценка содержания антител в препаратах ВВИГ: Пентаглобин, Октагам, при этом учитывались собственные данные производителей. Сопоставление данных титрования, полученных с помощью УПБ-РАЛ, с официальными результатами, представленными производителями, свидетельствует о прямой корреляционной зависимости между оцениваемыми показателями. Вместе с тем, целесообразно иметь межнациональный отраслевой стандарт при проведении контроля содержания антител направленного действия к антигенам УПБ.

Напротив, при сравнении результатов титрования ВВИГ «Октагам» получены результаты, свидетельствующие об обратной корреляции между показателями.

Таким образом, отечественная тест-система УПБ-РАЛ, позволяющая получать стабильные достоверные результаты при оценке содержания антител к антигенам УПБ в плазме и сыворотке крови доноров (Шобухова Т. С., 2004), в опытах титрования препаратов концентратов антител разных производств дает нестабильные результаты, что можно объяснить неспецифическим связыванием антител при определенных, пока невыясненных, условиях.

ОСТРАЯ ВИЧ-ИНФЕКЦИЯ *IN VITRO* И ПРОДУКЦИЯ ЦИТОКИНОВ ЛИМФОЦИТАРНЫМИ И МОНОЦИТАРНЫМИ КЛЕТКАМИ ЧЕЛОВЕКА

Перминова Н.Г., Вараксин Н.А. *, Рябичева Т.Г. *, Тимофеева Н.В. *, Субботин Д.В., Боярских У.А., Неклюдов В.В., Тимофеев И.В.

*ЗАО «Вектор-Бест», Кольцово, Новосибирская обл.; Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», Россия

В патогенезе ВИЧ-инфекции и СПИД дисбаланс цитокинов, продуцируемых Th1 и Th2 лимфоцитами и моноцитами, занимает центральное место, оказывая влия-

ние на силу ответа иммунной системы на специфические антигены вируса. Цитокиновая сеть задействована практически на всех этапах взаимодействия вирус-клетка, распространения ВИЧ-1/2 в макроорганизме, формирования иммунодефицита и развития оппортунистических инфекций. Рост ВИЧ-инфицированных в мире и в России стимулирует поиск эффективных лекарственных препаратов и оптимизацию протоколов лечения больных СПИД. Для лечения больных рекомендуется совместное применение некоторых цитокинов, например IL-1, IL-2, IL-7 и IL-12 с антиретровирусными препаратами. Вместе с тем известно, что применение интерферона увеличивает количество CCR5 рецепторов на клетках, являющихся мишенями ВИЧ-1/2. С другой стороны, TNF α , IL-1 β и IL-6 могут способствовать репликации ВИЧ, повышая экспрессию регуляторных генов вируса.

Целью нашей работы было сравнительное изучение спектра цитокинов, вырабатываемых при острой инфекции ВИЧ-1 перmissive культурой лимфобластоидных клеток человека МТ-4, а также ФГА-стимулированными лимфоцитами периферической крови здоровых доноров при инфекции и при воздействии анти-ВИЧ препаратов: RANTES и AMD-3100 (антагонистов хемокиновых корепепторов ВИЧ-1 CCR5 и CXCR4).

Материалы и методы. Моноцитарную фракцию крови выделяли из гепаринизированной крови здоровых доноров в градиенте плотности фиколл-верографина (плотность 1,077) по методу Boum (1968). Концентрацию цитокинов IL-4, IL-8, IL-1RA, TNF α , IFN γ , IFN α определяли в исходной сыворотке донора и культуральной среде в динамике инфицирования лимфоцитарных клеток вирусом, а также при обработке селективными по корепепторам ВИЧ химиопрепаратами – RANTES и AMD-3100. Для анализа цитокинов использовали иммуноферментные тест-системы производства ЗАО «Вектор-Бест» (Кольцово, Новосибирская обл.). Анализ образцов на содержание цитокинов проводили в соответствии с инструкцией к используемому набору.

Основные результаты. Уровень наработки цитокинов, определяемый в перmissive культуре лимфобластоидных клеток МТ-4 при инфекции ВИЧ-1 был значительно ниже, чем в первичной культуре донорских лимфоцитов. Культура моноцитарных клеток здоровых доноров при ВИЧ инфекции отвечала возрастанием наработки IL-4, TNF α и IFN γ , в то время как уровни IL-8, IL-1RA и IFN α при острой литической инфекции ВИЧ-1 заметно снижались. Наблюдались индивидуальные различия по уровню наработки IFN α в ответ на вирусную инфекцию в лимфо-

цитах, выделенных от разных доноров. Интересно отметить, что в присутствии анти-ВИЧ препарата AMD-3100 – антагониста корцептора ВИЧ CxCR4 уровень IFN α существенно возрастал, что коррелировало с защитой клеток от инфекции. В то же время уровни IL-8 и рецепторного антагониста IL-1RA значительно возрастали как при ответе на ФГА стимуляцию, так и в присутствии обоих препаратов-антагонистов CCR5 и CxCR4 хемокиновых рецепторов (RANTES и AMD-3100), не коррелируя с уровнем протективности клеток от ВИЧ-инфекции. По нашему мнению, необходимо не только определять цитокиновый статус у ВИЧ-инфицированных пациентов при назначении и выборе оптимальной схемы лечения, но также экспериментально оценивать индивидуальную цитокиновую реакцию лимфоцитов в ответ на вирусную инфекцию и специфические модуляторы иммунного ответа.

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА МЕТОДОВ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СПЕЦИФИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ К АЛЬФА-ФЕТОПРОТЕИНУ В СЫВОРОТКЕ ИММУНИЗИРОВАННЫХ КОЗ

Раев М.Б.^{2,3}, Орлова Е.Г.^{2,3}, Красных М.С.², Горбунова О.Л.², Родионов С.Ю.^{1,2}.

¹ Филиал Института иммунологии и физиологии УрО РАН, г. Екатеринбург, Россия;
² ЗАО «Институт новых медицинских технологий» г. Краснокамск, Россия;
³ Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, г. Пермь, Россия

При иммунизации животных тем или иным антигеном актуальна проблема количественного определения уровня специфических антител как в сыворотке, так и на этапах выделения и очистки. Широко используемый в настоящее время метод преципитации в геле по Оухтерлони имеет низкую чувствительность и не позволяет количественно оценить уровень специфических антител, а также весьма неудобен и длителен в процедурном исполнении, что ограничивает его применение.

Цель работы: сконструировать и сравнить по основным параметрам тест-системы для определения количества специфических антител. Для иммунизации коз использовали альфа-фетопроtein (АФП) человека. Уровень специфических антител к АФП в сыворотке крови иммунизированных коз оценивали турбидиметрическим методом, а также в «сендвич» варианте дот-блоттинга. Параллельно титр специфических антител к АФП определяли методом преципитации в геле по Оухтерлони по стандартной методике. Для дот-блоттинга сконструировали безинструментальную тест-систему, основанную на применении неферментных конъюгатов с частицами коллоидного углерода. АФП сорбировали на непористую (полистирол) или пористую твердую фазу (нитроцеллюлоза). Затем твердофазные носители инкубировали в сыворотке иммунизированных коз. Положительным контролем служили очищенные козы антигена против АФП человека. В качестве детектирующего реагента использовали конъюгат белка G с углеродом. Оценку результатов проводили визуально по черному окрашиванию зоны специфического связывания конъюгированного с углеродом белка G и козых антител комплексированных с АФП на поверхности твердой фазы. Для турбидиметрического определения в лунки 96 луночного полистирольного планшета вносили АФП с известной концентрацией и смешивали с раститрованной козьей сывороткой. Измерение оптической плотности проводи-

ли через 30 минут при длине волны 340 нм. Для оценки результатов строили калибровочный график зависимости изменения оптической плотности от титра специфических антител. Полученные результаты позволяют заключить, что чувствительность предложенной безинструментальной тест-системы для дот-блоттинга в «сендвич» варианте превосходит чувствительность метода преципитации в геле и турбидиметрического метода и позволяет выявлять иммуноглобулины G в концентрации до 1 нг/мл. Использование пористой твердой фазы повышает уровень чувствительности описываемой тест-системы. Следует отметить, что разработанный вариант тест-системы является универсальным и позволяет количественно детектировать в сыворотке антитела человека, кролика, крысы, мышей и коз любой специфичности в зависимости от иммобилизованного на подложке антигена, а также выявлять примеси иммуноглобулинов G, контаминирующих препараты, получаемые из сыворотки крови. Чувствительность турбидиметрического метода на порядок превосходит чувствительность метода преципитации в геле по Оухтерлони. Данные методы являются существенно более оперативными в процедурном исполнении, дающими не только качественную, но и количественную оценку. Быстрота и простота исполнения турбидиметрического анализа позволяет использовать его как экспресс-метод, что особенно привлекательно для скрининговых исследований.

ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ КРОВИ БОЛЬНЫХ ЖЕЛЕЗИСТЫМ РАКОМ ОРГАНОВ ЖКТ, ВЫЯВЛЕННЫМ ВПЕРВЫЕ ПРИ ЭНДОСКОПИЧЕСКОМ ИССЛЕДОВАНИИ

Рудаков Д.М., Хайруллина Р.М., Коценко Т.М., Чувиллина Е.В., Хисамова Н.Ф.

Детская Республиканская клиническая больница, Уфа, Россия

Оценка состояния кислородзависимой микробоцидности (КЗМ) у онкологических больных, как составляющей неспецифической резистентности организма, имеет особое значение ввиду известной роли микрофагов и НК-клеток в реализации противоопухолевой защиты.

Целью настоящей работы явилось исследование КЗМ у пациентов с впервые выявленным железистым раком органов ЖКТ. Многие физиологические и метаболические процессы в организме тесно связаны со свободнорадикальным окислением (СРО). В норме скорость СРО и содержание свободных радикалов поддерживается на определенном уровне. Нарушение процесса СРО представляет собой раннюю, неспецифическую реакцию организма на различные воздействия. При этом происходят структурно-функциональные повреждения клеточных мембран, меняется активность ряда ферментов и т.д., что становится молекулярной основой дальнейшего развития патологического процесса. С целью наибольшей чистоты и достоверности исследования, отбор крови для анализа производился сразу, после получения патогистологического заключения о наличии у больного опухоли ЖКТ и ее верификации. Нами были обследованы больные с диагнозами плоскоклеточного рака пищевода, аденокарциномы желудка, колоректальной аденокарциномы и пациенты с заболеваниями органов ЖКТ неопухолевой природы, послужившие группой контроля (табл.).

Для высокодифференцированных раков был характерен монотонный (уплощенный) тип ХЛ-кривой с низкими количественными показателями основных характеро-

ТАБЛИЦА. ЛОКАЛИЗАЦИЯ И СТЕПЕНЬ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ РАКА У ОБСЛЕДОВАННЫХ БОЛЬНЫХ

Локализация	группы, n			конт- роль
	высоко- дифференцированный	умеренно- дифференцированный	низко- дифференцированный	
Пищевод, плоскоклеточный рак	17	17	14	4
Желудок, железистый рак	13	18	19	4
Толстый кишечник, железистый рак	19	8	2	4

логических параметров ХЛ. Полученные нами данные свидетельствуют о реципрокных взаимоотношениях светосуммы и наклона ХЛ-кривой, с так называемыми «тушителями» ХЛ, концентрация которых увеличивается при нарушении проницаемости или целостности клеточных мембран. В случае с высокодифференцированными раками, это связано с распадом опухолевой ткани. Необходимо заметить, что высокодифференцированные раки ЖКТ редко выявляются по обращаемости в начале процесса, и поводом для эндоскопического обследования часто бывают симптомы, обусловленные процессом распада опухоли (изъязвление, кровотечение, прободение).

ХЛ больных с низкодифференцированными раками ЖКТ характеризовалась значимым увеличением светосуммы и наклона, и преобладанием гиперэргического типа ХЛ-кривой. Указанные особенности свидетельствуют о выраженной активации КЗМ в ходе инфильтративных форм воспаления, присущих данным формам рака с ранним инфильтративным ростом. Тип ХЛ-кривой и величина наклона указывают на высокую опсонизирующую способность сыворотки крови, а светосумма свечения является интегральным показателем значительной генерации активных форм кислорода.

Случаи с умереннодифференцированными раками ЖКТ были отмечены показателями ХЛ-кривой с промежуточными к ранее перечисленным формам рака, значениями. ХЛ-кривые, относились к разряду нейтральных, слабо отличающихся от нормальных по типу и количественным параметрам.

Таким образом, анализ полученных ХЛ данных позволил выявить корреляционную зависимость типа ХЛ-граммы от степени дифференцировки обнаруженного рака, независимо от локализации опухоли в отделах ЖКТ.

ЭПИТОПЫ МОЛЕКУЛ IgA, sIgA И SC, ВЫЯВЛЯЕМЫЕ С ПОМОЩЬЮ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ (МКАТ)

Самойлович М.П., Писарева М.С., Климович Б.В., Ибрагимова Д.Г., Грязева И.В., Климович В.Б.

Центральный научно-исследовательский рентгено-радиологический институт МЗСР РФ, Санкт-Петербург, Россия

Количество IgA, синтезируемого организмом человека, превышает объем продукции всех остальных классов Ig вместе взятых. IgA отличается разнообразием молекулярных форм и представлен двумя подклассами, один из которых (IgA2) имеет два аллотипических варианта. IgA является основным Ig в секретах слизистых и встречается в виде мономеров и олигомеров, содержащих наряду с несколькими молекулами IgA также J-цепь и фрагмент рецептора полимерных Ig – секреторный компонент (SC).

IgA и SC являются продуктами разных по происхождению клеток и имеют различный эволюционный возраст. Задача работы состояла в изучении антигенных свойств sIgA и SC человека, а также ряда позвоночных животных из разных таксономических групп.

Для выявления антигенных эпитопов использовали созданную в лаборатории панель МКАТ против SC, против sIgA и против альфа-цепей IgA человека. Объектами исследования служили препараты IgA, sIgA и SC из молока человека, а также образцы слюны позвоночных животных, принадлежащих разным таксонам – от рептилий до млекопитающих. Иммунохимическую характеристику эпитопов проводили с помощью нескольких вариантов твердофазного ИФА.

На IgA человека МКАТ выявляли семь эпитопов, общих для альфа-1 и альфа-2 цепей, три из которых принадлежали к линейным, остальные имели конформационную природу. Среди конформационных эпитопов два проявляли аллотипическую рестрикцию, т.к. были экспрессированы на молекулах IgA1 и IgA2m1, но отсутствовали на IgA2m2. Конформационную детерминанту, специфичную только для альфа-1 цепи, распознавало одно МКАТ. Все описанные эпитопы альфа-цепей сохраняли способность связывать МКАТ после присоединения J-цепи и SC.

Шесть МКАТ против sIgA выявляли на молекуле SC два иммунодоминантных кластера, включавших не менее 5 конформационных эпитопов.

На свободном SC с помощью МКАТ обнаружено 4 эпитопа, один из которых являлся линейным.

Исследование с помощью МКАТ антигенов секреторных Ig животных выявило в альфа-цепи один конформационный эпитоп, общий для человека, для лемура вари – представителя низших приматов и для кролика – представителя отряда зайцеобразных. Обнаружено еще два эпитопа, один – конформационный, а другой – линейный, общие для IgA человека и кролика. Из них конформационный эпитоп у человека экспрессирован только на альфа-одина цепи, а линейный – на альфа-цепях обоих субклассов. Среди эпитопов SC, экспрессируемых в молекуле sIgA, три конформационных эпитопа были общими для человека и кролика. Из них один эпитоп SC был обнаружен также в слюне представителя класса рептилий – сцинка. Этот же эпитоп был выявлен в sIgA лошади (отряд непарнокопытных).

Таким образом, с помощью панели МКАТ обнаружены конформационные и линейные эпитопы IgA, sIgA и SC человека. Выявление соответствующих эпитопов на секреторных Ig позвоночных животных показало, что наибольшее антигенное сходство для молекул sIgA имеется у человека и кролика. На SC описан эпитоп, общий для человека и для представителя рептилий – класса позвоночных, не имеющих молекул IgA.

ОПЫТ ИЗУЧЕНИЯ СОСТАВА ИММУНОГЛОБУЛИНОВ (Ig) В ИММУННЫХ КОМПЛЕКСАХ ПРИ РЕВМАТОИДНОМ АРТРИТЕ (РА)

Самойлович М.П., Сиваченко Е.Б., Григорьева А.Л.*, Климович В.Б.

Центральный научно-исследовательский рентгено-радиологический институт;

*Городской ревматологический центр, Санкт-Петербург, Россия

Циркулирующие иммунные комплексы (ЦИК), наряду с ревматоидными факторами (РФ), обнаруживают в сыворотках крови большинства пациентов с РА. Рутинные методы выявления РФ с помощью латекс-теста и ЦИК методом осаждения ПЭГ позволяют оценить их содержание, но не дают возможности судить о составе образующих их Ig.

Задача работы состояла в разработке подходов к исследованию изотипического спектра Ig в составе ЦИК при РА.

Объектом изучения служили сыворотки крови 12 пациентов с диагнозом РА, среди которых у 9 пациентов был выявлен РФ, трое были серонегативны. Контрольные сыворотки были получены от здоровых доноров. Для выявления ЦИК и одновременного определения изотипа составляющих их Ig использовали варианты двухцентрового твердофазного ИФА на основе МКАТ против изотипических маркеров Ig человека. Для извлечения Ig из сыворотки МКАТ против маркерных эпитопов альфа-, мю- или гамма-цепи иммобилизовали в ячейках полистироловых планшетов. Затем в них инкубировали исследуемые сыворотки, разведенные в 200 раз буферным солевым раствором, содержащим казеин. Выявление комплексов проводили с помощью меченных пероксидазой МКАТ, отличных по изотипической специфичности от иммобилизованных. Так, сочетание иммобилизованных МКАТ против гамма-цепей и меченных МКАТ против мю-цепей позволяло выявить комплексы IgG-IgM. Параллельно проводили определение и в реципрокном варианте. Аналогично определяли комплексы IgA-IgM и IgA-IgG.

Наиболее часто (у 6 пациентов) обнаруживали комплексы, состоящие из IgG и IgM. Самыми редкими были комплексы, в которые входили IgG и IgA – они выявлены у 2 пациентов. Комплексы, состоящие из IgA и IgM обнаружены только в тех сыворотках, которые содержали также комплексы IgG и IgM. Сопоставление результатов анализа комплексов в прямом и реципрокном вариантах не всегда давало совпадающие результаты. Так, комплексы, содержащие IgA и IgM были выявлены у 4 пациентов при извлечении на твердую фазу через альфа-цепи и только у двух пациентов при извлечении их из сыворотки с помощью МКАТ против мю-цепей. В серонегативных сыворотках, не содержавших РФ, с помощью двухцентрового ИФА также не удалось выявить ЦИК. В одной из сывороток, имеющих по данным клинико-лабораторных исследований РФ и ЦИК, с помощью двухцентрового ИФА ЦИК обнаружены не были. Причины этих расхождений предстоит выяснять.

Проведенная работа продемонстрировала возможности использования двухцентрового ИФА на основе МКАТ против Ig человека для определения состава Ig в ЦИК при РА и выявила аспекты проблемы, требующие дальнейших исследований.

РОЛЬ ГИСТАМИНА В ПРОДУКЦИИ АУТОАНТИТЕЛ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ АУТОИММУННОМ ПРОЦЕССЕ

¹Саттарова Р.С., ¹Муралинов Ж.К., ²Беляев Н.Н.

¹Казахский национальный аграрный Университет; Институт молекулярной биологии и биохимии им. М.А. Айтхожина, Алматы, Казахстан

Считается, что супрессорные Т-лимфоциты несут на своей поверхности H_2 -рецепторы, после стимуляции которых они секретируют супрессорный цитокин. В связи с этим, гистамин рассматривается в качестве естественного стимулятора иммуносупрессии. Аутоиммунный процесс характеризуется снижением толерантности к собственным антигенам, то есть, падением активности супрессорных клеток. Роль гистамина в этом процессе остается неясной.

Целью наших исследований было изучение влияния антигистаминной сыворотки на уровень гистамина в крови и развитие аутоиммунного процесса в экспериментальных условиях.

2 группам кроликов (по 3 в каждой группе) вводили тканевую экстракт печени крупного рогатого скота в присутствии гидроокиси алюминия. На 14-е и 17-е сутки животным 2-й группы вводили подкожно антигистаминную сыворотку по 0,02 мл на кг живой массы. Антигистаминную сыворотку получали гипериммунизацией кроликов конъюгатом гистамин-БСА. Титр аутоантител к тканевым антигенам печени определяли с помощью РНГА, используя эритроцитарный диагностикум, приготовленный на основе фиксированных эритроцитов барана, сенсibilизированных антигенами тканевого экстракта печени кролика. Количественное определение гистамина в плазме крови проводили спектрофлуориметрическим методом.

Введение ксеногенных печеночных антигенов приводило к продукции антител к печеночным аутоантигенам, титр которых достигал максимума на 21-е сутки (1:2133, $P < 0,03$). При этом одновременно повышалась концентрация гистамина в плазме крови, которая на 21-е сутки превышала исходный уровень в 23 раза ($0,0023 \pm 0,0009$ нг/мл – до иммунизации, $0,0533 \pm 0,0033$ нг/мл – на 21-е сутки). На 35-е сутки наблюдалось снижение средних значений титра аутоантител до 1:107 ($P < 0,05$). Однако уровень гистамина в плазме крови оставался высоким ($0,0500 \pm 0,0057$ нг/мл, $P < 0,01$). Введение антигистаминной сыворотки животным 2-й группы на фоне развивающегося процесса аутоиммунизации привело к резкому замедлению продукции аутоантител, титр которых на 21-е сутки не превышал в среднем 1:640 ($P < 0,001$). Уровень гистамина при этом значимо не отличался от уровня 14-х суток ($0,0300 \pm 0,0058$ нг/мл). На 35-е сутки аутоантитела к печеночным антигенам практически полностью исчезли из периферической крови 1:13 ($P < 0,5$), а уровень гистамина в плазме крови упал до нормы ($0,0017 \pm 0,0006$ нг/мл, $P < 0,6$). Развитие аутоиммунного процесса коррелировало с изменением уровня плазматического гистамина ($r = 0,60$). Введение антигистаминной сыворотки эту корреляцию существенно усиливало, доводя ее значение до $r = 0,96$. Полученные результаты свидетельствуют в пользу существования тесной связи между содержанием гистамина в периферической крови и развитием аутоиммунного процесса.

ЗНАЧЕНИЕ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТИПА СВЕЧЕНИЯ АНТИНУКЛЕАРНОГО ФАКТОРА У БОЛЬНЫХ С ДИФУЗНЫМИ БОЛЕЗНЯМИ СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ

Созина А.В., Лапин С.В., Маслянский А.Л.¹, Иливанова Е.П.¹, Тотолян Арег А.

НМЦ по молекулярной медицине МЗиСР РФ на базе СПбГМУ имени академика И.П. Павлова;¹ Ленинградская областная клиническая больница, Областной ревматологический центр, Россия

Введение. Антинуклеарный фактор (АНФ) является основным серологическим маркером диффузных болезней соединительной ткани (ДБСТ). АНФ рекомендуется определять с использованием в качестве субстрата клеточной линии Нер-2, что позволяет описывать тип свечения ядра.

Целью настоящего исследования было определить значение выявления типа свечения АНФ у больных с ДБСТ.

Материалы и методы. Нами было исследовано наличие АНФ, антител к дсДНК и антител к кардиолипину в сыворотках 141 пациента с подозрением на ДБСТ. Также были обследованы сыворотки 18 больных с клинически подтвержденным диагнозом системной красной волчанки (СКВ) и 5 больных с синдромом Шогрена (СШ). Активность течения СКВ оценивалась путем подсчета индекса SLEDAI. АНФ выявлялся методом непрямой иммунофлуоресценции с использованием в качестве субстрата перевиваемой клеточной линии аденокарциномы гортани человека Нер-2. Результат исследования считался положительным при титре сыворотки больше чем 1/40. Антитела к двуспиральной ДНК IgG и кардиолипину IgG/IgM выявлялись иммуноферментным методом. Статистическая обработка полученных результатов проводилась с помощью программы STATISTICA 6.0.

Результаты. Среди пациентов с подозрением на ДБСТ было выделено две группы. В первую вошли больные, обследованные на наличие АНФ и антител к дсДНК (111 человек), а во вторую – те пациенты, объем обследования которых включал также определение антител к кардиолипину (30 человек).

У 54% (60/111) пациентов из первой группы АНФ и антитела к дсДНК выявлены не были. У 38% (43/111) больных совместно обнаруживались АНФ и антитела к дсДНК в диагностических титрах, причем у 70% (30/43) этих пациентов был выявлен гомогенный тип свечения ядра АНФ. У 7,2% (8/111) определялся АНФ с мелкогранулярным типом свечения ядра без антител к дсДНК. Только у 1,8% (2/111) обследованных лиц при отсутствии АНФ, антитела к дсДНК определялись в низкой концентрации.

У одной пациентки из второй группы были обнаружены в высоких титрах АНФ, антитела к дсДНК и кардиолипину, при этом у двух больных из этой же группы АНФ выявлялся совместно только с антителами к кардиолипину IgG, без антител к дсДНК. В дальнейшем, у этих трех пациентов с наличием одновременно АНФ с антителами кардиолипину и/или дсДНК была диагностирована СКВ.

В группе больных с СКВ АНФ был выявлен в 100% (18/18) случаев, при этом у большинства пациентов 72% (13/18) АНФ определялся в титре 1/640 и выше. У 61% (11/18) был обнаружен гомогенный тип свечения ядра, у 33% (6/18) – крупногранулярный и у одного пациента

ядрышковый тип свечения АНФ. У больных с крупногранулярным свечением ядра АНФ индекс активности SLEDAI был в два раза ниже чем в группе больных с гомогенным типом свечения ядра АНФ (8 баллов±3,3 против 15 баллов±6 соответственно, $p=0,003$). У всех больных с наличием гомогенного типа свечения ядра АНФ определялись антитела к дсДНК в высокой концентрации. В группе больных с титром АНФ 1/640 и выше наблюдались повышение значения индекса SLEDAI.

Среди больных с СШ в 100% (5/5) случаев выявлялся АНФ с гранулярным типом свечения. Также у 80% (4/5) были повышены значения ревматоидного фактора. При объективном осмотре у всех пациентов из этой группы были увеличены размеры слюнных желез, и наблюдалась ксерофтальмия, сопровождающаяся снижением значений теста Ширмера, Норна и наличием признаков эпителиопатии.

Выводы. Выявление АНФ с гомогенным типом свечения ядра соответствует повышенной концентрации антител к дсДНК, а в группе больных с СКВ сочетается с высокими значениями индекса SLEDAI и, поэтому, может использоваться для оценки активности течения СКВ.

ПОЛУЧЕНИЕ ВЫСОКОАФФИННЫХ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ К АНТИГЕНУ ЛЯМБЛИИ ДЛЯ КОПРОДИАГНОСТИКИ ЛЯМБЛИОЗА

Степанов А.А.* , Сердюк О.А.* , Степанова И.И.* , Конаныхина С.Ю.* *

**Институт диагностики и профилактики социально значимых заболеваний, Москва;*

***НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия*

Лямблии – паразитические одноклеточные, обитающие в тонком кишечнике. Результаты обследования населения показывают, что в некоторых районах РФ инвазированность взрослых доходит до 20%, а детей – до 80%. Традиционное микроскопическое исследование фекалий и дуоденального содержимого на присутствие цист и/или трофозоитов *Giardia lamblia* позволяет выявить лишь до 50-72% инвазий. Серодиагностика (детекция антител к антигенам лямблий в сыворотке крови) тоже не является прямым доказательством инфекции, т.к. антитела появляются не сразу и определяются в течение нескольких месяцев (до 1,5 года) после элиминации. В настоящее время наиболее информативным считают копродиагностику лямблиоза по присутствию в фекалиях специфического антигена, что является прямым свидетельством наличия лямблий в ЖКТ.

Целью настоящего исследования явилось получение специфичных и высокоаффинных моноклональных антител к поверхностным антигенам цист *Lambliа intestinalis*, пригодных для разработки иммунохроматографического экспресс-теста для копроиммунодиагностики лямблиоза

На начальном этапе работы мыши линии BALB/c были иммунизированы выделенными в градиенте плотности сахарозы и отмывыми цистами лямблий. Предварительный отбор положительных клонов проводили с помощью реакции антител с цистами. Далее антитела тестировали с положительным и отрицательным образцами фекалий, подтвержденными с помощью микроскопического исследования и измерения в коммерческом ИФА-наборе.

Следующим этапом было получение более аффинных антител. Для этого на основе полученных антител были

синтезированы аффинные сорбенты. С помощью аффинной хроматографии из положительного образца фекалий был выделен поверхностный антиген цист лямблий и охарактеризован в электрофорезе и иммуноблоттинге. Образец, приготовленный в восстанавливающих условиях, содержал 3 основных белковых фракции: 28, 30 и 32 кД. Мыши снова были иммунизированы уже чистым антигеном и получены гибридомы, продуцирующие высокоаффинные антитела.

Была подобрана пара антител, дающих в иммунохроматографическом варианте анализа образцов фекалий результаты, коррелирующие с данными микроскопии и результатами, полученными в коммерческих ИФА-наборах. Чувствительность анализа составила примерно 4 нг/мл антигена, что соответствует чувствительности ИФА-наборов. Было также показано, что перекрестная реакция с антигенами *Entamoeba coli* и *E.histolytica* отсутствует.

Полученная тест-система была использована для мониторинга лечения лямблиоза. Детекция антигена в фекалиях в процессе лечения лямблиоза препаратом Макмирор показала, что на 2-й день после начала приема препарата концентрация антигена заметно возрастает, затем постепенно снижается и после 4-го дня антиген уже не определяется. Таким образом, полученные моноклональные антитела к поверхностному антигену цист лямблий можно использовать для диагностики и мониторинга лечения лямблиоза.

МОДЕЛЬ «EX VIVO» ДЛЯ ОЦЕНКИ ЭФФЕКТИВНЫХ АНТИ-ВИЧ СОЕДИНЕНИЙ

Субботин Д.В., Перминова Н.Г., Боярских У.А., Тимофеев И.В.

Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»;
Кольцово, Новосибирская обл., Россия

К настоящему времени в мире до сих пор не разработано адекватной экспериментальной модели ВИЧ-инфекции *in vivo*. Это связано с тем, что вирус иммунодефицита человека не вызывает идентичного заболевания, даже у близких к человеку приматов – шимпанзе или орангутанг, – при этом более далекие эволюционно виды млекопитающих не восприимчивы к данному типу ВИЧ-1/2. В тоже время эксперименты, выполняемые на моделях ВИЧ-инфекции *in vitro*, не могут адекватно передать условия заражения и распространения ВИЧ-инфекции, патогенез заболевания и представить возможность полноценного тестирования разрабатываемых анти-ВИЧ препаратов. Одним из вариантов экспериментальной модели ВИЧ инфекции, приближающейся к условиям *in vivo*, можно считать предложенную L. Margolis et al. (1997) методику культивирования фрагментов лимфоидной ткани человека, полученную из миндалин при оперативных вмешательствах.

Целью нашей работы является разработка модели ВИЧ-инфекции «ex vivo», которая может быть выполнена на фрагментах тканей (графтах), переживающих в искусственной питательной среде *in vitro*.

Методы. В данной работе использована технология создания ацеллюлярного графта с последующим заселением его различными видами культур клеток (стволовые клетки CD34⁺, эндотелиальные предшественники CD133⁺/CD34⁻, CD133⁺/CD34⁺; лимфоидные клетки CD3⁺/CD4⁺) и созданием комплексного аллогraftа (КА).

Культивирование клеточных субпопуляций и КА проводили в обогащенной среде RPMI-1640 с добавлением 15% фетальной сыворотки и ростовых факторов. Анализ клеточных маркеров выполняли с помощью моноклональных антител в реакции НИФ.

Результаты. Проведена оценка ВИЧ-1 инфекции индивидуальных и комбинационных популяций реплантируемых в КА клеток и токсического воздействия на них оригинальных анти-ВИЧ соединений. Планируется использовать КА в качестве модели «ex vivo» для оценки активных мембранотропных анти-ВИЧ соединений. В настоящее время на модели аллогraftа совместно с ИТПМ СО РАН разработаны методы характеристики и его контроля на этапах децеллюляризации с помощью методов лазерно-индуцированной флюоресценции (ЛИФ). В основе ЛИФ лежит известное свойство белков и входящих в их состав аминокислот люминесцировать под воздействием УФ излучения. Люминесцентный метод исследования белков позволяет определять их структуру, состав, состояние, динамические характеристики и др. Использование в качестве источника возбуждения УФ излучения позволяет исследовать люминесценцию образца в широком спектральном интервале, наблюдать перестройку спектров ЛИФ при развитии патологических изменений в нем. Проанализирована возможность изготовления ацеллюлярного графта из аорты экспериментальных животных – кролики породы «Шиншилла. Метод ЛИФ позволяет провести экспрессную оценку жизнеспособности КА и выполнить его мониторинг с динамической оценкой биофизического состояния в течение последующего наблюдения.

Таким образом, разработан подход для моделирования ВИЧ-инфекции *ex vivo* и возможной оценки в этой системе эффективных анти-ВИЧ соединений.

КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ АНТИТЕЛ К ОСТРОВКОВЫМ КЛЕТКАМ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ У БОЛЬНЫХ С САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ ТИП 1

Тихомирова Т.А., Лапин С.В., Толкачева Н.Ф*., Тотолян Арег А.

Центр по молекулярной медицине МЗ РФ
при СПбГМУ им.акад.И.П.Павлова;

* Детская городская больница им. К.А. Раухфуса
№ 19, Санкт-Петербург, Россия

Антитела к островковым клеткам поджелудочной железы (ICA), выявляемые методом непрямой иммунофлюоресценции, являются классическим иммунологическим маркером сахарного диабета тип 1 (CD1).

Цель работы. Определение клинико-лабораторной значимости выявления ICA у больных CD1 разных возрастных групп.

Материалы и методы. Были исследованы сыворотки 379 человек, составляющих четыре основные группы. В группу I были включены 165 детей моложе 15 лет с впервые выявленным CD 1; в группу II вошли 15 взрослых больных с впервые выявленным CD1; группу III составили 47 взрослых больных с текущим CD1 (продолжительность заболевания от 1 до 25 лет, средняя продолжительность 10,22±1,11 лет); группу IV составили 152 детей с текущим CD1 (продолжительность заболевания от 1 до 8 лет, средняя продолжительность 3,2±0,3 лет). Контрольную группу составили 70 человек, из них 30 детей и 40 взрослых.

В течение 3 лет 15 детей с CD1 для изучения динамики титра ИСА были исследованы повторно.

У всех больных были собраны анамнестические данные о течении диабета и предыдущих схемах инсулинотерапии, о характере контроля гликемии до госпитализации, о соблюдении диеты. У больных I и II групп учитывался характер дебюта заболевания, наличие кетоацидоза, у больных III и IV групп исследовалось наличие и характер диабетических осложнений.

Для выявления ИСА использовался метод непрямой иммунофлюоресценции на криосрезе ткани человеческой поджелудочной железы.

Результаты. В группе контроля ИСА обнаружено не было, таким образом, специфичность метода выявления ИСА составила 100%. Чувствительность метода в группе I составила 75,41%, в группе II – 57,14%, в группе III – 15,4%, а в группе IV – 37,5%.

При анализе клинических данных обнаружено, что выявление ИСА не зависит от пола больного, от дебюта заболевания и от наличия осложнений. ИСА встречаются достоверно чаще у больных с дебютом CD1 (группы I и II), чем у больных с текущим заболеванием (группы III и IV), в 75,6% и 21,8% соответственно, $p=0,0046$. При анализе больных всех групп наблюдалась достоверная отрицательная корреляция между выявлением ИСА и среднесуточной дозой вводимого инсулина, на которой достигнута компенсация заболевания ($r=-0,42$; $p=0,0036$). Наблюдения за группой детей с CD1 в динамике подтвердило, что с течением стажа заболевания снижается титр и процент обнаружения ИСА и повышается потребность в экзогенном инсулине.

Выводы. Мы обнаружили зависимость между наличием ИСА и среднесуточной дозой экзогенного инсулина, необходимого для компенсации гликемии. Возможно, островковые антитела косвенно свидетельствуют о сохранности некоторой массы β -клеток, которые, продуцируя эндогенный инсулин, снижают потребность пациента в экзогенном инсулине.

ВОЗМОЖНОСТИ ИММУНОЦИТОХИМИЧЕСКОГО МЕТОДА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КЛЕТОЧНОГО СОСТАВА ЛАКУН НЕБНЫХ МИНДАЛИН ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ТОНЗИЛЛИТЕ

Уткина Л.А., Мингалеева Е.В., Комарова Л.С., Куртова А.В., Зуева Е. Е., *Начаров П.В., Тотолян Арег А.

СПбГМУ им. акад. Павлова, Научно-методический центр по молекулярной медицине МЗ РФ;
*ГУ СПб НИИ уха, горла, носа и речи МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия

Хронический тонзиллит является широко распространенным заболеванием, плохо поддающимся консервативному лечению. Тонзиллэктомия, являющаяся, по сути, удалением периферического органа иммунной системы, приводит к прогрессирующему снижению защитных возможностей организма. Патогенез хронизации воспаления и превращения небных миндалин в очаг инфекции при хроническом тонзиллите мало изучен в связи с трудностями получения биопсийного материала без тонзиллэктомии. Для оценки иммунологической состоятельности небных миндалин в последние двадцать лет отоларингологи используют диагностические тесты, сочетающие бактериологическое и морфологическое исследование смыва крипт миндалин.

Целью данной работы было определение возможностей иммуноцитохимического метода для определения иммунофенотипического профиля иммунокомпетентных клеток в материале смыва крипт небных миндалин.

В исследование включены данные по тридцати взрослым пациентам, страдающим различными формами хронического тонзиллита. Смывы лакун небных миндалин получены стандартным методом.

Осаждение клеток для получения цитологических препаратов осуществлено с помощью центрифугирования смывов при 300g в течение 10 минут. Выделенные клетки были нанесены на предметные стекла. Фиксация антигенных структур осуществлена с помощью холодного (+4°C) ацетона (ЧДА) в течение 5 минут. Наличие специфических мембранных рецепторов определяли при помощи непрямого иммунопероксидазного метода с использованием немеченых моноклональных антител к CD3, CD45, HLA-DR, DP, DQ и системы визуализации EnVision (DAKO, Дания). Полуколичественная оценка цитологических препаратов по маркерам проведена методом световой микроскопии при суммарном увеличении 600 (окуляры x15, объектив x40). В качестве положительного контроля качества проведения методики параллельно с образцами смывов крипт миндалин исследованы цитологические препараты лимфоцитов периферической крови доноров.

На светооптическом уровне в цитологическом препарате можно идентифицировать два типа клеток: эпителиоциты и лимфоидные элементы. Соотношение клеток в смывах крипт значительно варьирует, несмотря на то, что у всех пациентов установлен диагноз хронический тонзиллит вне обострения. У части пациентов выявлено крайне низкое содержание лимфоцитов в смывах крипт, в то время как клетки эпителия присутствуют в значительном количестве и часто формируют пласты. Даже при большом количестве клеток лимфоидного ряда, количество CD3-положительных Т-лимфоцитов не превышает 15% от всех клеточных элементов. Обращает внимание, что интенсивность окрашивания Т-лимфоцитов смывов крипт миндалин значительно ниже по сравнению с лимфоцитами периферической крови. Почти все клетки, морфологически соответствующие лимфоцитам, позитивны по маркерам CD45 и HLA-DR, DP, DQ. В настоящее время нами не выявлены В-лимфоциты в клеточном материале смывов крипт миндалин пациентов, страдающих хроническим тонзиллитом.

ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ ЛАКТОФЕРРИНА ПРИ РЕАКТИВНЫХ АРТРИТАХ

Чаплыгина Л.Н., Данилова Т.Г., Бородулина И.М., Цыганова Л.А.

Медицинская академия, Областная клиническая больница, Ярославль, Россия

Лактоферрин – железосвязывающий гликопротеин, являющийся одним из факторов неспецифической защиты организма, маркером острофазовых реакций и активности воспалительного процесса.

Цель исследования: изучение состояния лактоферрина крови и лактоферрина нейтрофилов, фагоцитарной активности нейтрофилов, белков острой фазы воспаления (С-реактивного протеина, РФ), их изменений в зависимости от варианта течения, степени активности с учетом взаимосвязей у больных РеА.

Материал и методы. Лактоферрин крови и лактоферрин нейтрофилов определяли иммуноферментным методом с использованием тест системы «Вектор-Бест» (г. Новосибирск), фагоцитарную активность нейтрофилов – со стафилококком штамма 209, уровень СРП полуколичественным латекс-тестом. Группу сравнения составили 20 здоровых лиц. Обследовано 45 больных реактивными артритом, среди них 64,4% мужчин и 35,6% женщин среднего возраста $32,6 \pm 2,1$ года с длительностью заболевания $2,7 \pm 0,6$ года.

Результаты. Преобладали больные с урогенитальной формой заболевания (86,7%). При использовании ПЦР-диагностики у 15 больных выявлены уреоплазмы, у 7 – микоплазмы, у 5 – хламидии. У 22,2% пациентов обнаружены антитела к хламидиям, СРП – у 20 (44,4%), РФ – у 5 (11,1%). У всех больных было выявлено достоверное увеличение содержания лактоферрина крови (ЛФ) – $544,19 \pm 104,51$ нг/мл по сравнению со здоровыми ($141,48 \pm 55,75$ нг/мл; $p < 0,05$) и ЛФ нейтрофилов ($71,73 \pm 4,65$ и $44,77 \pm 3,75$ нг/мл, соответственно; $p < 0,01$). После лечения антибиотиками уровень ЛФ крови и ЛФ нейтрофилов снизился ($434,7 \pm 79,19$ и $70,63 \pm 5,95$ нг/мл), и оставался достоверно более высоким, чем в группе контроля ($p < 0,05$). При остром течении заболевания было обнаружено достоверное увеличение уровня ЛФ крови по сравнению с хроническими вариантами течения заболевания ($671,05 \pm 183,23$ нг/мл; $p < 0,05$ и $435,1 \pm 122,92$ нг/мл; $p > 0,05$), и уровня ЛФ нейтрофилов в том и другом случаях ($68,1 \pm 6,3$ и $70,3 \pm 7,93$ нг/мл; $p < 0,05$). У больных РеА было зафиксировано увеличение ЛФ крови и ЛФ нейтрофилов по мере роста активности воспалительного процесса, с III степенью активности – увеличение ЛФ крови в 2,4 раза, а ЛФ нейтрофилов в 1,4 раза по сравнению с больными с I степенью; еще более значительное увеличение ЛФ крови было отмечено при III степени активности по сравнению со здоровыми – в 9 раз, а ЛФ нейтрофилов – в 2 раза ($p < 0,05$). У всех больных РеА выявлено нарушение фагоцитарной активности (ФА) нейтрофилов, снижение всех показателей ФА. Так, средние показатели фагоцитарного индекса (ФИ), фагоцитарного числа (ФЧ), и индекса бактерицидности (ИБН) были достоверно ниже при затяжном и особенно хроническом течении по сравнению с показателями при остром течении ($p < 0,05$). Фагоцитарная функция лейкоцитов достоверно снижалась по мере повышения активности процесса: при I степени активности ФИ составлял $73,12 \pm 1,91\%$, при II – $68,56 \pm 2,64\%$, при III – $66,5 \pm 1,85\%$; ФЧ – $8,5 \pm 0,37\%$; $7,67 \pm 0,38\%$; $6,8 \pm 1,4\%$ и ИБН – $11,54 \pm 1,55\%$; $11,02 \pm 1,3\%$; $9,6 \pm 2,4\%$, соответственно. При корреляционном анализе установлена прямая умеренная связь между уровнями ЛФ крови, ЛФ нейтрофилов и РФ ($p < 0,05$); ЛФ крови и показателями КФЧ ($p < 0,01$) и ИБН ($p < 0,004$); также между ЛФ нейтрофилов и СРБ ($p < 0,01$); обратная умеренная корреляционная связь между уровнями ЛФ крови и ФИ ($p < 0,02$) и ФЧ ($p < 0,03$), а также ЛФ нейтрофилов и ФИ ($p < 0,03$).

Таким образом, при реактивных артритах выявлены нарушения функциональной активности нейтрофилов: увеличение уровня лактоферрина крови и лактоферрина нейтрофилов, с положительной динамикой их содержания после антибиотикотерапии; нарушение ФА нейтрофилов (ФИ, ФЧ и ИБН), выраженность которых зависит от особенностей течения заболевания. Следовательно, показатели ФА нейтрофилов информативны для дифференциальной диагностики вариантов течения

заболевания. Анализ взаимосвязей различных маркерных белков (ЛФ, РФ, СРБ) позволяет сделать вывод о важной роли лактоферрина в патогенезе реактивных артритов и как критерия эффективности фармакотерапии у больных РеА.

ИЗМЕНЕНИЕ ПУЛА «СРЕДНИХ МОЛЕКУЛ» В ПРОЦЕССЕ И ПОСЛЕ РЕГИОНАРНОЙ МАЛООБЪЕМНОЙ ГЕМОПЕРФУЗИИ У БОЛЬНЫХ С ГНОЙНО-ВОСПАЛИТЕЛЬНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ПАЛЬЦЕВ И КИСТИ

Эйсмонт Ю.А., Бутко Б.Е., Буркова Н.В., Кокорин К.В., Зугаирова О.Н., Коньчев А.В., Кузнецов С.И.

ГОУ ДПО Медицинская академия последипломного образования, Санкт-Петербург, Россия

Считается, что вещества низкой и средней молекулярной массы (ВН и СММ) являются интегральным показателем, характеризующим метаболические нарушения в организме. Они признаны одним из общепринятых маркеров эндогенной интоксикации, которая возникает при различных по этиологии, патогенезу и клиническим проявлениям заболеваниях. ВН и СММ представляют собой гетерогенную популяцию молекул, которым присущи основные критерии токсичности: многообразие вызываемых патофизиологических изменений на молекулярном, клеточном и системном уровнях. По своему строению они близки к регуляторным пептидам, поэтому способны соединяться и блокировать рецепторы любой клетки, неадекватно влияя на ее метаболизм и функции. Значительное повышение уровня ВН и СММ в крови при ряде хирургических заболеваний коррелировало с тяжестью эндотоксикоза и являлось прогностическим в плане развития гнойных осложнений. Существуют данные об увеличении пула ВН и СММ при гнойно-некротических заболеваниях пальцев и кисти, как в системном кровотоке, так и в крови, оттекающей из зоны поражения конечности.

Цель работы состояла в оценке влияния регионарной малообъемной гемоперфузии (РМОГ) на пул ВН и СММ плазмы и эритроцитов у больных с гнойно-воспалительными заболеваниями пальцев и кисти пораженной конечности. Было обследовано 20 больных с заболеваниями пальцев и кисти, которым провели курс РМОГ (3 процедуры с интервалом 1-2 дня). В контрольной группе была исследована кровь 12 здоровых волонтеров, которым гемоперфузию не проводили. Концентрацию ВН и СММ у больных опытной группы определяли в 4-х точках. 1-я – до процедуры РМОГ; 2-я – в крови, оставшейся в колонке; 3-я – через 20 мин после окончания процедуры; 4-я – спустя 1 час после последнего забора крови. В качестве гемоконтактного препарата в колонках использовали угольный гемосорбент СКТ-6А-ВЧ. Концентрацию ВН и СММ регистрировали в плазме и на эритроцитах по методу Малаховой М.Я. и соавт. (1989) на спектрофотометре СФ-121.

Анализ предварительных результатов показал, что суммарная интоксикация в пораженной конечности больных выражена незначительно и показатели ВН и СММ практически не отличаются от контрольной группы как в плазме, так и на эритроцитах. При взаимодействии крови с гемоконтактным препаратом в колонке помимо активационных процессов начинает работать и сорбцион-

ный механизм, в результате чего концентрация ВН и СММ в плазме в пробах с колонки достоверно снижается в 3 раза. Однако, ввиду малого объема гемосорбента, а значит и его малой суммарной сорбционной емкости, данный механизм не может составить существенной конкуренции в сорбционной активности эритроцитам и значительно снизить количество ВН и СММ на их клеточной мембране. В числовых выражениях концентрация ВН и СММ на эритроцитах до процедуры и в пробе с колонки практически одинаковы ($23,7 \pm 0,13$ и $23,9 \pm 0,47$). Не отличаются от исходных (до процедуры) показатели ВН и СММ и в 20-ти минутных пробах ($23,8 \pm 0,13$ – для эритроцитов и $12,4 \pm 0,21$ – для плазмы). Однако, следует обратить внимание, что в пробах крови, взятых через час после снятия жгута, отмечается тенденция к снижению концентрации ВН и СММ как на эритроцитах, так и в плазме ($22,5 \pm 0,31$ и $11,5 \pm 0,19$, соответственно). Снижение показателя эндогенной интоксикации, очевидно, не может быть связано с сорбционными механизмами, учитывая фактор времени. Скорее всего, включается механизм эндогенной санации, связанный с активационными

процессами, которые, в конечном итоге, приводят к ретормаживанию фагоцитарных функций клеток, способных к поглощению, т.е. профессиональных фагоцитов, локализованных в перфузируемом районе. Если брать крайние точки исследования (1-ый забор крови – до начала РМОГ и последний забор – 1-часовая проба после 3-ей процедуры РМОГ), то прослеживается достоверное снижение концентрации ВН и СММ как на эритроцитах ($27,2 \pm 0,71$ и $21,4 \pm 0,54$), так и в плазме ($13,1 \pm 0,23$ и $12,1 \pm 0,27$). Процесс более выражен на эритроцитах, что вполне закономерно, т.к. между концентрациями ВН и СММ на мембранах эритроцитов и в плазме должно существовать динамическое равновесие. По мере исчезновения токсичных продуктов из плазмы, эритроциты отдают часть сорбированных на мембране молекул, пополняя пул свободных ВН и СММ, снижая при этом фиксированный пул и восстанавливая динамическое равновесие.

Таким образом, курс РМОГ у больных с гнойно-некротическими заболеваниями пальцев и кисти приводит к достоверному снижению эндогенной интоксикации в крови перфузируемого региона.