



---

# Аллергология и иммунология

Том 19 № 3  
2018

**Редакционная коллегия**

**Главный редактор      Р.И. СЕПИАШВИЛИ**

И.П. Балмасова, Н.М. Бережная, А.Г. Габитов, И.С. Гуцин,  
С.М. Деев, Н.И. Ильина, З.Г. Кадагидзе, А.В. Караулов,  
В.А. Козлов, Р.В. Петров, В.И. Покровский, Е.С. Северин,  
Т.А. Славянская (ответственный секретарь),  
Г.Т. Сухих, А.В. Тутельян, Т.Г. Федоскова, Р.М. Хаитов,  
Р.А. Ханферьян, В.А. Черешнев

---

*Москва*

*Издательство «Медицина – Здоровье»*

---

# Аллергология и иммунология

*Официальный орган Союза аллергологов и иммунологов СНГ*

Том 19 № 3  
2018

Volume 19 Number 3  
2018

## Allergology and Immunology

*Official Journal of the CIS Society of Allergology and Immunology*

---

---

Журнал *Аллергология и иммунология*  
цитируется в реферативных и справочных изданиях:  
**Current Contents**  
**Index Medicus**  
**Excerpta Medica**  
**Immunology Abstracts**  
**ASCA**  
**Science Citation Index**

---

---

Журнал *Аллергология и иммунология* зарегистрирован Государственным комитетом РФ по печати 12.08.1999 г. Регистрационный номер 019204.

Охраняется законом РФ № 5351-1 «Об авторском праве и смежных правах» от 9 июля 1993 г. Воспроизведение всего издания или его части любым способом запрещается без письменного разрешения издателя. Нарушение закона будет преследоваться в судебном порядке.

Решением Высших аттестационных комиссий (ВАК) России и других стран СНГ журнал *Аллергология и иммунология* включен в перечень периодических научных и научно-технических изданий, выпускаемых в Российской Федерации, в которых рекомендуется публикация основных результатов диссертаций на соискание ученой степени кандидата и доктора наук (медицинские и биологические науки).

### Адрес редакции

117513 Москва, ул. Островитянова, 4, Институт иммунофизиологии  
Тел.: (495) 735-1414; Факс: (495) 735-1441; E-mail: [info@wipocis.org](mailto:info@wipocis.org)  
Web site: [www.isir.ru](http://www.isir.ru)

© 2018 Российская академия наук

© 2018 Всемирная организация по иммунопатологии

© 2018 Союз аллергологов и иммунологов СНГ

© 2018 Издательство «Медицина–Здоровье»

# Аллергология и иммунология

Том 19 № 3  
2018

| Статьи и обзоры                                                                                                                                                                             |     | Full Papers and Reviews                                                                                                                                                                                 |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Э.Д. Джуманиязова, С.В. Сальникова, Т.А. Славянская<br><i>Антигенные и молекулярно-генетические маркеры диагностики и прогнозирования при уротелиальном раке</i>                            | 129 | E.D. Dzhumaniyazova, C.V. Salnikova, T.A. Slavyanskaya<br><i>Antigenic and molecular genetic markers of urothelial cancer: diagnosis and prognosis</i>                                                  |
| М.В. Стёганцева, В.А. Шинкевич, Е.М. Тумар, А.Н. Мелешко<br><i>Иммунологическая эффективность ДНК-вакцинации против нейробластомы в комбинации с полиэтиленимином и Salmonella enterica</i> | 135 | M.V. Stegantseva, V.A. Shinkevich, E.M. Tumar, A.N. Meleshko<br><i>Immunological effectiveness of DNA-vaccination against neuroblastoma in combination with polyethylenimin and Salmonella enterica</i> |
| А.Б. Филина, О.А. Свитич, Ю.И. Аммур, А.К. Голенков, Е.Ф. Клинушкина, В.В. Зверев<br><i>Изучение влияния CXCL12 на хемотаксис клеток миеломнобластного лейкоза и экспрессию гена TLR4</i>   | 140 | A.B. Filina, O.A. Svitich, Yu.I. Ammur, A.K. Golenkov, E.F. Klinushkina, V.V. Zverev<br><i>The effect of CXCL12 on the chemotaxis of myelomonoblastic leukemia cells and the TLR4 expression</i>        |
| В.А. Черешнев, Б.Г. Юшков, М.В. Черешнева, Т.В. Гаврилова, А.Ю. Гаврилова<br><i>Иммунопатофизиология воспаления</i>                                                                         | 145 | V.A. Chereshnev, B.G. Yushkov, M.V. Chereshneva, T.V. Gavrilova, A.Y. Gavrilova<br><i>Immunopathophysiology of inflammation</i>                                                                         |
| Тезисы докладов лауреатов I Международной олимпиады по аллергологии и иммунологии для студентов и молодых ученых до 33 лет                                                                  | 148 | I International Youth Olympiad in Allergology and Immunology. Abstracts                                                                                                                                 |
| Авторский указатель                                                                                                                                                                         | 128 | Author Index                                                                                                                                                                                            |
| Правила для авторов                                                                                                                                                                         | 174 | Author Instructions                                                                                                                                                                                     |
| Расписание циклов повышения квалификации врачей различных специальностей и медсестер на кафедре аллергологии и иммунологии Российского университета дружбы народов (2018–2019)              | 175 | Chair of Allergology and Immunology, Russian University of Peoples' Friendship, Schedule of Postgraduate Education Courses (2018–2019)                                                                  |

**АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ К ТЕЗИСАМ ДОКЛАДОВ  
I МЕЖДУНАРОДНОЙ ОЛИМПИАДЫ ПО АЛЛЕРГОЛОГИИ  
И ИММУНОЛОГИИ ДЛЯ СТУДЕНТОВ И МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ**

- Агеева И.В. 165  
Адамия Н.А. 163  
Адилов А.А. 159  
Азизова З.Б. 154  
Алексеев А.К. 155  
Алешина Г.М. 151  
Аляхнович Н.С. 167  
Аммур Ю.И. 160  
Аникин Д.А. 164  
Антохина Ю.А. 169  
Ахременко Я.А. 170  
Бахтин А.А. 156  
Безруков Т.Д. 148  
Беставаши А.А. 153  
Бошьян Р.Е. 148  
Брагвадзе Б.Г. 165  
Бугаева П.Е. 158  
Быков И.М. 170  
Быстрицкая Е.П. 165  
Венедиктов А.А. 151  
Витчук А.В. 169  
Волошан О.А. 156  
Воробьев С.В. 161  
Галич Е.Н. 169  
Ганковская Л.В. 165  
Ганковский В.А. 165  
Гашимов Г.А. 158  
Гогодзе Н.М. 163  
Годовалов А.П. 149  
Голенков А.К. 160  
Грибалева Е.О. 152  
Деев С.М. 158  
Демко И.В. 164  
Джафаров К.Ф. 148  
Джумаева Д.Н. 154  
Джуманиязова Э.Д. 161  
Диланян Л.А. 152  
Думбадзе М.А. 163  
Дурнев С.О. 149  
Жернов Ю.В. 149  
Зверев В.В. 160  
Зорин Д.А. 159  
Зырянов С.К. 166  
Иванов Д.А. 166  
Ищенко О.В. 164  
Кадырова Ю.А. 170  
Калетюк М.А. 162  
Калмахелидзе Б.Г. 165  
Капустина В.А. 165  
Карпунина Т.И. 149  
Ким В.С. 148  
Киртадзе К.Г. 163  
Киселева Д.В. 158  
Клименко Т.А. 151  
Клинушкина Е.Ф. 160  
Клопнев Е.В. 159  
Кобзаренко Е.Е. 156  
Коваленко С.Н. 161  
Козырева Т.Ф. 162  
Кокряков В.Н. 151  
Криволапова М.В. 154  
Кудрявцев И.В. 154  
Кудрявцев С.В. 161  
Кузнецова Р.Н. 154, 161  
Куприянов С.В. 149  
Кусельман А.И. 169  
Малиновская Н.А. 164  
Матушкина В.А. 157  
Мелешко А.Н. 159  
Мешалкина Д.А. 164  
Миронова О.Б. 153  
Молчанов А.И. 155  
Морозов И.А. 149  
Намазова-Баранова Л.С. 165  
Нестерова А.А. 166  
Новиков Д.К. 164, 167  
Норка А.О. 161  
Обухова А.А. 167  
Очкуренко А.Е. 157  
Павленко В.Н. 150  
Пантелеймонова П.М. 168  
Партенадзе Н.М. 163  
Пахнова Л.Р. 167, 168  
Пахомова Н.М. 166  
Плотникова Н.А. 163  
Понасенко О.А. 163  
Пономарева С.И. 170  
Попов К.А. 170  
Рахматуллина Н.М. 168  
Савин Т.В. 154  
Самойлова М.В. 162  
Саранчина В.В. 166  
Свитич О.А. 148, 160, 165  
Собко Е.А. 164  
Соловьева И.Л. 169  
Соловьёва А.А. 170  
Соловьёва И.А. 164  
Стёганцева М.В. 159  
Степанов М.С. 156  
Ступин Н.А. 155  
Тер-Левонян А.С. 152  
Тетерин Ю.В. 150  
Трунова О.С. 166  
Тумар Е.М. 159  
Унтерсмаер Е.У. 167  
Филина А.Б. 160  
Халтурина Е.О. 152  
Харбегашвили М.Х. 165  
Чепанов С.В. 158  
Чермохин Д.А. 160  
Чувирова А.Г. 163  
Чудотворов К.Н. 158  
Шилова О.Н. 158  
Шинкевич В.А. 159  
Юпатова Т.Г. 164  
Янкелевич И.А. 151  
Adamia N. 172  
Blanca M. 173  
Chelidze L. 172  
Chikovani T. 171  
Chkhaidze N. 172  
Colombo P. 173  
Dorofeeva Y. 173  
Eliš D. 156  
Focke-Tejkl M. 173  
Inácio Fio 173  
Iobadze M. 171  
Ivanova D.N. 171  
Janikashvili N. 171  
Kharashvili L. 172  
Khurtsidze G. 172  
Kikodze N. 171  
Kirtadze K. 172  
Lebedenko A.A. 171  
Mari A. 173  
Matoshvili M. 172  
Mazmishvili K. 171  
Mizandari M. 171  
Nanava N. 172  
Pantsulaia I. 171  
Pires A.P. 173  
Robakidze A. 172  
Semedo F. 173  
Semernik O.E. 171  
Singh Akshay 172  
Tomaz E. 173  
Tophuria D. 172  
Valenta R. 173

## АНТИГЕННЫЕ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ ДИАГНОСТИКИ И ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ПРИ УРОТЕЛИАЛЬНОМ РАКЕ

Э.Д. Джуманиязова<sup>1</sup>, С.В. Сальникова<sup>1,2</sup>, Т.А. Славянская<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Российский университет дружбы народов, Москва

<sup>2</sup>Институт иммунофизиологии, Москва

Уротелиальная карцинома мочевого пузыря является распространенным злокачественным образованием, которое вызывает около 150 000 смертей в год во всем мире. До сих пор никакие молекулярно-прицельные агенты не были одобрены для лечения заболевания. Тем не менее, последние достижения в области онко-иммунологии, геномики, иммунобиотехнологии определили иные стратегии не только для разработки маркеров диагностики, прогнозирования опухолевых заболеваний, но и открыли перспективы для создания принципиально новых препаратов для иммунотерапии. Идентификация опухолевых антигенов и понимание биологии представления антигена также дали большое количество разнообразных и новых исследований в отношении противораковых вакцин. Раковотестикулярные антигены (РТА) являются наиболее перспективной мишенью при создании противоопухолевых вакцин, поскольку отличаются выраженной иммуногенностью, определяются в различных типах опухолей и имеют ограниченные паттерны экспрессии в здоровых тканях взрослого организма. Создание персонифицированных дендритноклеточных противоопухолевых вакцин для лечения уротелиального рака (УР) связано не только с выбором оптимальных антигенов для активации дендритных клеток, но и определением оптимальных параметров культивирования клеток для обеспечения наибольшей экспрессии РТА опухолевыми клетками. В работе представлен анализ РТА в опухолевых культурах РМП при длительном культивировании, генетических мутационных изменений УР в зависимости от злокачественности опухоли. Доказана взаимосвязь цитогенетического профиля с экспрессией опухолеспецифических РТА.

**Ключевые слова:** уротелиальная карцинома, раковотестикулярные антигены, противоопухолевые вакцины, кариотип, культуры клеточных линий.

**Адрес для корреспонденции:** Э.Д. Джуманиязова  
117198 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 6,  
Кафедра иммунологии и аллергологии Медицинского института РУДН  
E-mail: enar2017@yandex.ru

УДК 616.62-006, 616.006-62

Достижения в области фундаментальных наук – иммунологии, геномики, молекулярной биологии, наномедицины – внесли значительный вклад в изучение иммуннопатогенетических особенностей развития различных заболеваний, в том числе онкологических [3–6, 12–14, 23–25], способствовали появлению новых научных медицинских направлений на стыке нескольких специальностей, а также внедрению в клиническую практику принципиально новых методов диагностики и лечения [7–10, 15, 17, 19–21, 44]. Актуальной проблемой в лечении онкологических заболеваний является разработка методов специфической иммунотерапии, одним из видов которой являются противоопухолевые вакцины. Наиболее перспективной мишенью при их создании являются раковотестикулярные антигены (РТА), поскольку отличаются выраженной иммуногенностью, определяются в различных типах опухолей и имеют ограниченные паттерны экспрессии в здоровых тканях взрослого организма. Высокий показатель мутационной нагрузки при уротелиальном раке (УР), уступающий только меланоме и раку легких, определяет чувствительность опухоли к иммунотерапевтическим методам воздействия и делает её одной из наиболее перспектив-

ных мишеней для иммунотерапии [1, 2, 26, 28, 31, 34, 40–43, 47]. В ряде исследований были продемонстрированы высокие уровни экспрессии РТА клетками УР [29, 33, 36–38, 45–46]. В настоящее время изучено более 100 представителей этой группы антигенов, их которых около 30 – закодированы в X-хромосоме, включая такие высокоиммуногенные семейства, как MAGE-A, GAGE, BAGE и NY-ESO-1. Частота экспрессии РТА зависит от типа опухоли. Так, для меланомы, рака яичников, рака легких и УР характерна высокая экспрессия РТА, тогда как для колоректального рака и рака простаты – низкая [29]. Возможно, что именно значительное количество мутаций в опухоли, имеющей высокий уровень экспрессии опухолессоциированных антигенов для их представления иммунной системе, является важным фактором эффективности иммунопрепаратов.

Создание противоопухолевой дендритноклеточной вакцины (ДКВ) для лечения УР включает в себя не только выбор оптимальных антигенов, но и определение оптимальных параметров культивирования опухолевых клеток.

Цель данного экспериментального исследования – провести сравнительный анализ экспрессии РТА и мо-

лекулярно-генетических мутаций (МГМ) при различных клинических формах УР, а также разработать оптимальные условия для выращивания опухолевых культур, стабильно экспрессирующих РТА при длительном культивировании, и потенциально пригодных для создания противоопухолевых ДКВ против УР [11, 16, 18, 22, 35, 39, 47].

## Материалы и методы

В работе изучены 24 образца опухоли, из которых 18 (75%) были представлены мышечно-инвазивной формой (МИФ) и 6 (25%) мышечно-неинвазивной формой (МНИФ) УР. Транспортировку опухолевого материала и культивирование опухолевых клеток осуществляли на питательной среде (ПС) DMEM/F12 (ПанЭко, Россия). Для оценки благоприятного температурного режима, образцы опухоли от каждого пациента на сутки отправляли в холодильные камеры с разными температурными условиями (0°C; +4°C и +8°C). Оценку жизнеспособности проводили через каждые 24 часа в течение 6 дней. Дезагрегацию опухоли проводили двумя методами: автоматическим механическим и энзиматическим. Опухолевые клетки культивировали в CO<sub>2</sub> инкубаторах в условиях 100% влажности при 37°C, атмосфере с 5% содержанием углекислого газа.

Для оптимизации культивирования клеток УР подбирали условия (различные питательные среды, ростовые добавки и факторы), при которых отмечали максимальную скорость прироста клеток УР на третьи сутки их культивирования.

Кроме того, исследовали влияние ростовых факторов инсулина-трансферрина-селенита натрия, ростовой добавки для эпителиальных клеток и готовой бессывороточной селективной среды для культивирования эпителиальных клеток человека Panser 628 (PAN-Biotech®, США) на скорость пролиферации клеток УР.

С целью подбора оптимальных условий для замораживания исследовали метод быстрой заморозки криопробирок с опухолевыми клетками непосредственно в холодильнике с температурой -80°C и метод постепенного снижения температуры с помощью программного замораживателя Mr. Frosty™ Freezing Container (Thermo Scientific™, США). Количество снятых клеток и их жизнеспособность оценивали в автоматическом счетчике клеток Countess (Invitrogen, США).

Дальнейшее культивирование клеток УР осуществляли в CO<sub>2</sub>-инкубаторе. Пассирование проводили с использованием смеси равных объемов растворов Версена и трипсина [31]. В своей работе руководствовались ранее описанными в литературе методами [27, 30]. 10 стабильно перевиваемых опухолевых культур исследовали на ранних (до 10-го) и более поздних (свыше 30-го) пассажах. Для исследования мутационных изменений в опухолевых образцах использовали метафазные клетки, полученные после 24-часовой обработки колхицином в конечной концентрации 0,04 мкг/мл. Монослой клеток отделяли от поверхности культуральных флаконов, центрифугировали, ресуспендировали в гипотоническом растворе 0,075 М KCl экспонировали 35–45 мин при t=37°C. После центрифугирования и удаления супернатанта добавляли охлажденный фиксатор – мета-

нол-уксусную кислоту в соотношении 3:1. Данную процедуру проводили трижды. Полученные клетки раскапывали на охлажденные влажные стекла, помещали в термостат на 24 часа при t=56°C, затем препараты обрабатывали раствором трипсина и окрашивали по Гимза. Препараты анализировали с учетом международной классификации хромосом. В качестве клона рассматривали 2–3 клетки с идентичными повреждениями; в случае моносомии (при отсутствии одной и той же хромосомы) таких клеток должно было быть не менее трех. Число анализируемых клеток в культуре зависело от количества выявленных клонов и составляло от 20 до 100. Структурные и численные изменения хромосом определяли с учетом современной номенклатуры [32]. Экспрессию РТА оценивали методом проточной цитометрии на аппарате FACS Canto II с использованием моноклональных антител к РТА: MAGE (FL-309), GAGE3 (N10), BAGE (R-15), NY-ESO-1 (E978) (Santa Cruz Biotechnology, США). Для математической обработки данных применяли пакет статистических программ SPSS 23.0 for Windows (SPSS, Chicago, IL, США). Статистически значимыми считали значения с доверительным интервалом не менее 95%, при p≤0,05.

## Результаты и обсуждение

Несмотря на различия жизнеспособности исходных опухолевых клеток, исходный фон был посчитан для каждого образца, которые в дальнейшем подвергались различным воздействиям в соответствии с поставленными в работе задачами. Было отмечено, что снижение жизнеспособности клеток УР в условиях 24-часовой экспозиции при температуре +4°C было минимальным – на 3,3±0,4%. В то же время транспортировка и хранение биоматериала в течение суток при 0°C и +8°C приводили к потере жизнеспособности опухолевых клеток на 7,14±0,7% и 11,8±1,5% соответственно, p≤0,05. Последующее более длительное хранение биоматериала (от 4-х до 6 суток) при аналогичных температурных режимах: 0°C; +4°C и +8°C показали резкое падение жизнеспособности клеток. При этом даже при +4°C, начиная со вторых по шестые сутки, гибель клеток составила 9±1,9% и 66,7±4,7% соответственно. При других температурных режимах (0°C и +8°C) в те же сроки жизнеспособность клеток УР резко снижалась, в среднем, на 21,5–88,5% и 32,2–92,5% соответственно, p≤0,01.

После определения оптимального временного и температурного режимов транспортировки и хранения, клетки УР, обладающие наибольшей жизнеспособностью подвергали различным методам дезагрегации. Для работы использовали биоматериал, который хранили в стерильных пробирках/контейнерах в ПС при +4°C не более 24 часов с жизнеспособностью клеток не ниже 80%.

В экспериментальных исследованиях установлено, что жизнеспособность опухолевых клеток при механической дезагрегации биоматериала УР была достоверно выше и составляла от 75,8 до 87,8% по сравнению с ферментативным способом обработки опухоли, где выживаемость при I и II вариантах соответственно составила от 25,1 до 31,7% и от 50,7 до 60,5%, p≤0,01.

Скорости пролиферации клеток в культуре была различной и зависела от условий культивирования – ПС и концентрации эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС). Так, что в среде DMEM/F12 с L-глутамином и добавлением 5% ЭТС количество клеток УР на 3 сутки культивирования было  $20,500 \pm 4,100$ . При использовании RPMI-1640 с аналогичными добавками и 5% содержанием ЭТС количество клеток УР, выросших в лунках планшета, было  $19,600 \pm 4,300$ ,  $p > 0,05$ . Отмечено, что с увеличением концентрации ЭТС в питательных средах, количество клеток УР возрастало и составило для DMEM/F12 с L-глутамином/RPMI-1640 с L-глутамином, соответственно:  $22,700 \pm 3,900/21,300 \pm 4,100$  (10% ЭТС) и  $25,000 \pm 8,100/24,000 \pm 4,300$  клеток (15% ЭТС).

При добавлении в среду 20% ЭТС выявлено достоверно значимое увеличение темпов прироста клеток, что составило  $34,600 \pm 4,200$  для DMEM/F12 и  $29,200 \pm 4,200$  для RPMI-1640,  $p < 0,05$ . Дальнейшее повышение концентрации ЭТС до 25% не влияло на скорость пролиферации клеток УР, где их пролиферативная активность была на уровне  $34,900 \pm 4,400$  при культивировании на среде DMEM/F12 и  $31,100 \pm 3,900$  клеток – на среде RPMI-1640.

Основываясь на результатах предыдущего эксперимента, для дальнейшего изучения эффективности добавления других ростовых факторов и добавок на пролиферацию клеток УР качестве полной питательной среду (ППС) использовали питательную среду DMEM/F12 с L-глутамином и добавлением 20% ЭТС, как наиболее соответствующую для обеспечения оптимального роста клеток УР. Для изучения скорости прироста клеток на третьи сутки культивирования в экспериментальные лунки 96-луночного планшета с ППС в каждую лунку добавляли по 10,000 КУК и ростовые факторы – ITS, MEGS, либо их комбинации. В качестве контроля использовали лунки с ППС и клеток УР без добавления ростовых добавок. Кроме того, в отдельные ячейки клеток УР высевали в селективную бессывороточную питательную среду для культивирования эпителиальных клеток человека Panser 628. Результаты проведенных экспериментов показали, что при добавлении к ППС одного из ростовых факторов – ITS или MEGS скорость пролиферации клеток УР на третьи сутки культивирования была выше по сравнению с контролем, либо культивированием клеток в бессывороточной среде Panser 628. Установлено, что на третьи сутки в лунках ППС+ITS количество клеток составляло  $38,600 \pm 3,900$ , а ППС+MEGS –  $42,300 \pm 4,100$ . Добавление в питательную среду обоих ростовых добавок (ППС+ITS+MEGS) приводило к достоверно значимому увеличению скорости пролиферации клеток УР –  $45,600 \pm 4,200$ ,  $p < 0,05$ .

В контрольных ячейках планшета (культивирование в ППС без добавления других ростовых факторов) количество клеток полученных на третьи сутки культивирования увеличилось до  $34,600 \pm 4,200$ . Применения селективной бессывороточной питательной среде для культивирования эпителиальных клеток человека Panser 628 по своей эффективности было сопоставимо с контролем (культивированием клеток УР на ППС). Количество

клеток в ячейках планшета с данной средой было  $35,000 \pm 4,300$ .

Исследование эффективности различных способов криоконсервации проводили на 21 образце клеток УР. В результате проведенных исследований были установлены различия в жизнеспособности клеток, замороженных методом быстрой заморозки (рутинный метод) и методом постепенного снижения температуры с помощью программного замораживателя. Следует отметить, что жизнеспособных клеток в образцах клеток УР перед заморозкой составляло  $96,8 \pm 1,9\%$ . При использовании рутинного метода количество жизнеспособных клеток УР было достоверно ниже ( $88,9 \pm 3,4\%$ ) по сравнению с методом, где использовали программный замораживатель –  $94,1 \pm 2,2\%$ ,  $p < 0,05$ .

От больных с разными формами инвазии УР было получено 10 стабильно перевиваемых клеток УР, которые изучали на наличие экспрессии РТА на ранних (до 10-ти) и более поздних (свыше 30-ти) пассажах. Результаты сравнительных исследований показали, что в культурах клеток УР на ранних пассажах с высокой частотой обнаруживали экспрессию РТА. В частности, MAGE-70%; BAGE-30%; GAGE – 40%; NY-ESO-1 – 50%. В 70% опухолевых культур регистрировали экспрессию, по меньшей мере, одного из анализируемых РТА, а в 20% – всех исследованных РТА. В процессе культивирования отмечено снижение количества РТА, экспрессируемых клеточными линиями. Из проанализированных 10 образцов – 6 были представлены МИФ УР и 4 МНФ УР. Установлено, что у больных с МИФ УР экспрессия NY-ESO-1 была в 7 (38,9%); MAGE в 15 (83,3%); GAGE в 8 (44,4%) и BAGE – в 9 (50%) случаях. 2 образца опухоли экспрессировали все 4 РТА (11,1%), 5 – три из 4-х РТА (27,8%). В образцах МНФ УР экспрессию NY-ESO-1, MAGE и BAGE регистрировали в отдельных образцах (по одному антигену в каждой опухоли), что составило по 16,7% случаев для каждого РТА. GAGE был выявлен в 2-х образцах (33,3%). В двух образцах экспрессия РТА отсутствовала, а в двух определяли экспрессию сразу двух изучаемых РТА (33,3%). В 66,7% случаев был представлен один из четырех изучаемых РТА. Установлено, что экспрессия РТА в образцах была неоднородной. При длительном культивировании клеток УР (более 30-и пассажей) отмечали достоверное снижение процентного содержания клеток, экспрессирующих РТА –  $28,2 \pm 4,6\%$ , вплоть до полного исчезновения,  $p < 0,05$ . Так, при цитофлуориметрическом исследовании образцов опухолевых клеток УР пациента Т. с МНФ опухоли высокой степени злокачественности (T1N0M0/GIII) на 5-м и 30-м пассажах установлено, что экспрессия РТА группы MAGE на 5-м пассаже составляла 78,6% по сравнению с 39,8% MAGE-позитивных клеток, выявленных на 30-м пассаже,  $p < 0,05$ . Суммарное количество клеток УР, экспрессирующих РТА, в одном образце на ранних пассажах, в среднем, составляло 48%, в то время как экспрессия РТА у клеток УР, прошедших более 30 пассажей, была значительно меньше – 28,2%,  $p < 0,05$ . Экспрессия MAGE, в среднем, составила 55,4% на ранних пассажах и 39,3% – на поздних. Доля клеток, позитивных по экспрессии NY-ESO-1, в первичных клеточных культурах составила, в сред-

нем, 42,3%, на поздних пассажах эта цифра была значительно ниже – 24,1%,  $p < 0,05$ . Клетки, экспрессирующие GAGE и BAGE, обнаруживали в 46,8% и 41,9% на ранних этапах культивирования. В культурах, прошедших 30 и более пассажей, эта цифра составила соответственно 20,5% и 27,5%,  $p < 0,05$ .

При молекулярно-генетическом анализе культуры клеток уротелиальной низкодифференцированной карциномы высокого злокачественного потенциала (T1N0M0 high grade) пациента Т. (61 год), исследованной на 9 пассаже, были обнаружены изменения в кариотипе, затрагивающие 9 пар хромосом, в которой происходит делеция короткого плеча в локусе 21p (del(9)(p21)). На 34-м пассаже отмечали более значительные изменения кариотипа клеток опухолевой культуры: увеличение количества хромосомных мутаций и моносомии по 15, 16, 17, 19 хромосомам. Наибольшее число хромосомных изменений было выявлено на поздних пассажах. При кариотипировании клеток низкодифференцированного УР высокого злокачественного потенциала (T2N0M0 high grade) пациента Р. (68 лет) на 36-м пассаже был определен следующий хромосомный набор: 53-55,X,-Y,t(1;7), +del(1)(q22)×2, +del(1)(q21), +del(1)(p22), +del(2)(p13), +del(3)(p), 4,+5,del(7)(q11.2), t(7;12)(p;q), +t(9;12), +del(11)(q), 12q+, +t(12;17), t(13;17)(q;p), 15p+,+16,+der(16), -17,-18,+19,-21,-22. На 38-м пассаже кариотип культуры клеток уротелиальной низкодифференцированной карциномы высокого злокачественного потенциала (T2N0M0 high grade) пациента Р. (71 год) также имели значительные хромосомные изменения: 53,X-Y, i(1q), +del(1)(p22), del(1)(q12), del(1)(q11), del(1)(q23), del(3)(p11), +der(6), del(7)(q12), +t(9;12), -10, del(11)(p13), der(11), -13, -15, +16, -17, 18, +20, -21.

В наших исследованиях установлено, что все исследуемые опухолевые культуры имели характерные для клеток УР молекулярно-генетические изменения. Чаще всего определяли следующие изменения кариотипа клеток: делецию 9 хромосомы (66,7%), отсутствие Y-хромосомы (50%) и моносомию 13 и 17 хромосом (33,3%). В единичных случаях регистрировали изменения в хромосомах 1, 3, 7 и трисомию 7 хромосомы. Результаты сравнительных исследований показали, что при длительном пассировании в части культур происходит значительное увеличение количества генетических изменений в виде разделения прежде однородной популяции на субклоны, различающиеся плоидностью (до 56 хромосом) и количеством измененных хромосом, что согласуется с данными других исследователей [47]. Можно предположить, что трансформация опухолевых клеток в культуре *in vitro* идет еще более быстрыми темпами по сравнению с ее развитием *in vivo*.

При сопоставлении уровня экспрессии РТА и молекулярно-генетического профиля пациентов с УР обнаружена достоверная корреляция роста мутационных изменений клеток со снижением экспрессии РТА (GAGE, BAGE, MAGE и NY-ESO-1),  $p < 0,05$ . Было отмечено, что отдельные культуры сохраняли как цитогенетический профиль, так и стабильную экспрессию РТА при многократных пассажах.

В результате проведения комплексного изучения особенностей и оптимизации условий транспортировки, выделения, культивирования клеток УР, проведения цитогенетического анализа и экспрессии РТА на жизнеспособных опухолевых поверхностях были получены и подготовлены к депонированию две верифицированные опухолевые линии со стабильной экспрессией РТА с МНИФ и МИФ УР на 50-м и 47-м пассажах, соответственно.

## Заключение

На основе оценки жизнеспособности клеток определены оптимальные условия подготовки опухоли для культивирования, включающие: транспортировку и хранение биоматериала, метод дезинтеграции, выбор питательной среды, необходимые ростовые факторы и добавки, метод криоконсервации.

Выявлены различия в экспрессии РТА опухолевыми клетками МНИФ и МИФ УР. Для клеток МИФ УР характерен больший спектр экспрессии РТА по сравнению с МНИФ.

Определена прямая зависимость уровня экспрессии РТА от длительности культивирования клеток УР.

Проведена оценка молекулярно-генетических изменений клеток УР в зависимости от степени злокачественности и инвазии опухоли. При этом установлено, что количество хромосомных аббераций достоверно увеличивается при МИФ по сравнению с МНИФ УР ( $p < 0,05$ ).

Установлена зависимость роста мутационных изменений клеток со снижением экспрессии РТА клетками опухоли.

При культивировании опухолевых клеток необходимо учитывать, что трансформация мутационных изменений в культуре *in vitro* идет более быстрыми темпами по сравнению с ее развитием *in vivo*.

Подготовлены две верифицированные культуры клеточных линий МИФ и МНИФ УР. Применение клеточных культур УР на ранних пассажах, отличающихся постоянством цитогенетических изменений и стабильной экспрессией РТА, являются перспективными для создания аутологических и аллогенных ДКВ на основе РТА.

## Литература

- Балдуева И.А., Карицкий А.П., Кулева С.А., Нехаева Т.Л., Новик А.В., Данилова А.Б., Проценко С.А., Пипиа Н.П., Славянская Т.А., Авдонкина Н.А., Сальникова С.В., Сепиашвили Р.И., Беляев А.М. Иммуноterapia рака: проблемы и перспективы // *Аллергология и иммунология*. 2015. Том 16. № 4. С. 354–357.
- Балдуева И.А., Новик А.В., Карицкий А.П., Кулева С.А., Нехаева Т.Л., Данилова А.Б., Проценко С.А., Семенова А.И., Комаров Ю.И., Пипиа Н.П., Славянская Т.А., Авдонкина Н.А., Сальникова С.В., Беляев А.М., Сепиашвили Р.И. Иммуноterapia рака: современное состояние проблемы // *Аллергология и иммунология*. 2015. Том 16. № 4. С. 354.
- Косовский Г.Ю., Славянская Т.А. Оценка эффективности комбинированной лимфотропной иммунотерапии у больных внегоспитальной пневмонией на фоне базисной антибактери-

- альной терапии // *Аллергология и иммунология*. 2003. Том. 4. № 2. С. 51–53.
4. Кудрявцева И.В., Славянская Т.А., Трунов А.Н., Трунова Л.А. Иммунологические показатели у больных ревматоидным артритом // *Бюллетень Сибирского отделения Российской академии медицинских наук*. 1999. Том 19. № 3,4. С. 66–68.
  5. Кудрявцева И.В., Славянская Т.А., Трунов А.Н., Трунова Л.А. Уровни аутоантител к ядерным ДНК, лактоферрина и некоторые иммунологические показатели у больных ревматоидным артритом // *Бюллетень Сибирского отделения Российской академии медицинских наук*. 1999. Том 19. № 3-4. С. 66–68.
  6. Немцова М.В., Кушлинский Н.Е. Молекулярный патогенез рака мочевого пузыря // *Альманах клинической медицины*. 2015. Том 41. С. 79–88.
  7. Сальникова С.В., Славянская Т.А. и др. Новые подходы и достижения в лечении рака мочевого пузыря // *Int. J. Immunoreh.* 2015. Vol. 17. # 2. С. 87.
  8. Сальникова С.В., Славянская Т.А. и др. Современные подходы и достижения в лечении рака мочевого пузыря // *Аллергология и иммунология*. 2016. Том 17. № 1. С. 50–51.
  9. Сальникова С.В., Славянская Т.А., Авдонкина Н.А. Современные подходы и достижения в лечении рака мочевого пузыря // *Аллергология и иммунология*. 2016. Том 17. № 1. С. 50–51.
  10. Сальникова С.В., Славянская Т.А., Балдуева И.А., Авдонкина Н.А. Инновационные технологии в лечении рака мочевого пузыря // *Аллергология и иммунология*. 2016. Том 17. № 1. С. 21–26.
  11. Сальникова С.В., Славянская Т.А. Сравнительная характеристика уровня экспрессии опухолеассоциированных антигенов при различных формах инвазии рака мочевого пузыря // *Аллергология и иммунология*. 2016. Том 17. № 4. С. 258.
  12. Сепиашвили Р.И. Физиология иммунной системы. М.: Медицина-Здоровье. 2015. 327с.
  13. Сепиашвили Р.И., Балмасова И.П. Иммунные синапсы: от теории к клинической практике // *Молекулярная медицина*. 2008. №1. С. 14–22
  14. Сепиашвили Р.И., Балмасова И.П., Славянская Т.А. Современная концепция иммунореабилитации // *International Journal on Immunorehabilitation*. 1997. № 6. С. 5.
  15. Сепиашвили Р.И., Беляев А.М. Иммунотерапия рака: проблемы и перспективы // *Аллергология и иммунология*. 2015. Том 16. № 4. С. 354–357.
  16. Славянская Т.А., Авдонкина Н.А., Сальникова С.В. Оптимизация условий получения жизнеспособной первичной культуры клеток уротелиальной карциномы // *Аллергология и иммунология*. 2016. Том 17. № 3. С. 176–179.
  17. Славянская Т.А., Авдонкина Н.А., Сальникова С.В., Балдуева И.А. Противоопухолевые вакцины: потенциальные мишени, современные разработки и перспективы использования // *Российский иммунологический журнал*. 2016. Том 10(19). № 2 (1). С. 498–500.
  18. Славянская Т.А., Сальникова С.В. Анализ экспрессии раково-тестикулярных антигенов на клетках опухолевых культур рака мочевого пузыря // *Аллергология и иммунология*. 2016. Том 17. №4. С. 257.
  19. Славянская Т.А., Сальникова С.В. и др. Противоопухолевые вакцины: потенциальные мишени, современные разработки и перспективы использования // *Российский иммунологический журнал*. 2016. Том 10(19). № 2(1). С. 498–500.
  20. Славянская Т.А., Сальникова С.В. Иммунологические критерии и маркеры для диагностики и прогнозирования рака мочевого пузыря // *International Journal on Immunorehabilitation*. 2009. Vol. 11. № 1. P. 24.
  21. Славянская Т.А., Сальникова С.В., Авдонкина Н.А., Сепиашвили Р.И., Балдуева И.А. Целенаправленная терапия больных с уротелиальной карциномой // *Аллергология и иммунология*. 2016. Том 17. № 2. С. 153.
  22. Славянская Т.А., Сальникова С.В., Сепиашвили Р.И. Хромосомные абберации и экспрессия опухолеассоциированных антигенов опухолевыми культурами рака мочевого пузыря при длительном культивировании // *Аллергология и иммунология*. 2016. Том 17. №4. С. 257–258.
  23. Славянская Т.А., Сепиашвили Р.И. Роль цитокинов в иммунопатологии // *Аллергология и иммунология*. 2004. Том 5. № 1. С. 42.
  24. Славянская Т.А., Сепиашвили Р.И., Вишняков М.И., Чихладзе М.В. Иммунологический мониторинг больных хроническим бронхитом в динамике восстановительной иммунореабилитации // *International Journal on Immunorehabilitation*. 1999. № 11. С. 70.
  25. Смирнова Т.А., Пономарева Е.П., Ханферян Р.А., Колесников В.В. Опыт применения Ронколейкина при терапии язвенной болезни желудка, ассоциированной с *Helicobacter Pylori*, в амбулаторных условиях // *Терапевтический архив*. 2009. Том 81. № 2. P. 30–35.
  26. Alexandrov L.B., Nik-Zainal S., Wedge D.C., et. al. Signatures of mutational processes in human cancer // *Nature*. 2013. Vol. 500. P. 415–421.
  27. Cheryl D.H., Cindy L.M. Basic Cell Culture Protocols // *Methods in Molecular Biology*. 2013. Vol. 946. P. 363–395.
  28. Cordon-Cardo C., Dalbagni G., Saez G. T., Oliva M. R., Zhang Z. F., Rosai J. Human cancer. p53 mutations in human bladder cancer: Genotypic versus phenotypic patterns // *Int. J. Cancer*. 2013. Vol. 56(3). P. 347–353.
  29. Dyrskjot, L, Zieger, K, Lildal, T.K., Reinert, T., Gruselle, O., Coche, T., Borre, M., Orntoft, T.F. Expression of MAGE-A3, NY-ESO-1, LAGE-1 and PRAME in urothelial carcinoma // *British Journal of Cancer*. 2012. Vol. 107. P. 116–122.
  30. Freshney R.I. Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications. John Wiley & Sons, Inc. USA: Sixth Edition, 2013. P. 463–466.
  31. Heim, S., Mitelman, F. Cancer Cytogenetics: Chromosomal and Molecular Genetic Aberrations of Tumor Cells // England: Wiley-Blackwell, 2015. 632 p.
  32. McGowan-Jordan, J., Simons, A., Schmid, M. ISCN: an international system for human cytogenomic nomenclature // Basel, New York: Karger, 2016. 140 p.
  33. Mengus, C., Schultz-Thater, E., Coulot, J., Kastelan, Z., Goluza, E., Coric, M., Spagnoli, G.C., Hudolin, T. MAGE-A10 cancer/testis antigen is highly expressed in high-grade non-muscle-invasive bladder carcinomas // *Int. J. Cancer*. 2013. Vol. 132. P. 2459–2463.
  34. Ragai R.M., Robin D.H. Human Cell Culture Protocols // *Methods in Molecular Biology*. 2012. Vol. 7651. P.31–43.
  35. Salknikova S.V., Slavyanskaya T.A. Comparative characteristics of the level of expression of tumor-associated antigens in various forms of invasion of bladder cancer // *International Journal on Immunorehabilitation*. 2016. Vol. 18. № 2. P. 129.
  36. Salknikova S.V., Slavyanskaya T.A. Comparative characteristics of the level of expression of tumor-associated antigens in various forms of invasion of bladder cancer // *Int. Proc. Filodiritto "Allergy, Asthma, COPD, Immunophysiology & Immunorehabilitation: Innovative Technologies."* Ed. R.Sepiashvili. 2017. P. 273–279.
  37. Salknikova S.V., Slavyanskaya T.A., Ivanchenko L.P., Sepiashvili R.I. The advantages of the combined modality therapy of muscular non-invasive bladder cancer // *Int. J. on Immunoreh.* 2016. Vol. 18. # 2. P. 129–130.
  38. Slavyanskaya T., Avdonkina N., Salknikova S., Sepiashvili R. Cytogenetic analysis of tumor cultures for preparation of personalized antitumor vaccines against bladder cancer // *Allergy*. 2017. Vol. 72 (Suppl.) S103. Ref. 0473: 329.
  39. Slavyanskaya T., Salknikova S. Analysis of expression of cancer-testicular antigens on the tumor cell cultures of bladder cancer // *International Journal on Immunorehabilitation*. 2016. Vol. 18. # 2. P. 128.

41. Slavyanskaya T., Salnikova S. Chromosome aberrations and the expression of tumor-associated antigens by tumor cultures of bladder cancer with long-term cultivation // *Int. Proc. Filodiritto "Allergy, Asthma, COPD, Immunophysiology & Immunorehabilitation: Innovative Technologies."* Ed. R.Sepiashvili. 2017. P. 265–272.
42. Slavyanskaya T., Salnikova S., Sepiashvili R., et al. Targeted therapy of patients with urothelial carcinoma // *Int. Proc. Filodiritto Allergy, Asthma & Immunophysiology: Innovative Technologies.* Ed. By R. Sepiashvili. 2016. P. 281–288.
43. Slavyanskaya T.A., Avdonkina N.A., Salnikova S.V., Sepiashvili R.I., Baldueva I.A. Prospects for the use of immunobiological markers for diagnosis and prognosis of bladder cancer // *International Journal on Immunorehabilitation.* 2016. Vol. 18. # 1. P. 56.
44. Slavyanskaya T.A., Salnikova S.V. Immunologic criteria and markers for diagnostics and prognosis of urinary bladder cancer // *International Journal on Immunorehabilitation.* 2009. Vol. 11. # 2. C. 180.
45. Slavyanskaya T.A., Salnikova S.V., et al. Targeted therapy of patients with urothelial carcinoma // *Int. J. Immunoreh.* 2016. V. 18. № 1. P. 55–56.
46. Slavyanskaya T.A., Salnikova S.V., Sepiashvili R.I. Chromosome aberrations and the expression of tumor-associated antigens by tumor cultures of bladder cancer with long-term cultivation // *International Journal on Immunorehabilitation.* 2016. Vol. 18. #№ 2. P. 128–129.
47. Zhang, X., Zhang, Y. Bladder Cancer and Genetic Mutations. *Cell Biochem Biophys.* 2015. Vol. 73. # 1. P. 65–69.

## Antigenic and molecular genetic markers of urothelial cancer: diagnosis and prognosis

E.D. Dzhumaniyazova<sup>1</sup>, C.V. Salnikova<sup>1,2</sup>, T.A. Slavyanskaya<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Peoples' Friendship University of Russia (RUDN University), Moscow

<sup>2</sup>Institute of Immunophysiology, Moscow

Urothelial carcinoma of bladder is a common malignancy which causes about 150.000 deaths per year around the world. So far, there are no molecularly targeted agents have been approved for the disease's treatment. Nevertheless, the latest achievements in the field of oncoimmunology, genomics, immunobiotechnology have identified other strategies not only for the development of markers in the diagnosis, prognosis of tumor diseases, but also prospects for the creation of fundamentally new drugs for immunotherapy were opened up. The identification of tumor antigens and the understanding of the biology of antigen presentation have also given large number of diverse and new researches on cancer vaccines. Cancer/testis antigens (CTA) are the most prospective target in the creation of anti-cancer vaccines, since they differ in high immunogenicity, determined in different types of tumors and have limited expression patterns in healthy adult tissues. The creation of personalized dendritic cell-based cancer vaccine for the treatment of urothelial cancer is associated not only with the choice of optimal antigens for activation of dendritic cells, but also the determination of the optimal cell culture parameters to ensure the greatest expression of the CTA by tumor cells. This article presents the analysis of cancer/testis antigens in tumor cultures of the bladder cancer with the long-term cultivation, genetic, mutational changes in the urothelial cancer, depending on the tumor malignancy. The interrelation of cytogenetic profile with the expression of tumor-specific CTA is proved.

**Key words:** urothelial carcinoma, cancer-testis antigens, anti-tumor vaccine, karyotype, cell culture.

## Календарь конференций

6–9 декабря 2018

Флоренция, Италия

### КОНФЕРЕНЦИЯ WAO WISC



22–26 февраля 2019

Сан-Франциско, США

### ЕЖЕГОДНЫЙ КОНГРЕСС АМЕРИКАНСКОЙ АКАДЕМИИ ПО АЛЛЕРГОЛОГИИ, АСТМЕ И ИММУНОЛОГИИ (AAAAI)



## ИММУНОЛОГИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ДНК-ВАКЦИНАЦИИ ПРОТИВ НЕЙРОБЛАСТОМЫ В КОМБИНАЦИИ С ПОЛИЭТИЛЕНИМИНОМ И *SALMONELLA ENTERICA*

**М.В. Стёганцева, В.А. Шинкевич, Е.М. Тумар, А.Н. Мелешко**

Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии  
и иммунологии, Боровляны, Беларусь

Одной из причин неэффективности противоопухолевого иммунитета является низкая реактивность иммунных клеток по отношению к опухолевым антигенам. ДНК-вакцинация позволяет преодолеть толерантность к собственным антигенам и индуцировать иммунный ответ. Для усиления иммуногенности могут быть использованы различные синтетические и бактериальные носители. Конъюгирование ДНК-вакцины с полиэтиленимином позволяет защитить молекулы ДНК от деградации и увеличивает эффективность трансфекции клеток, тем самым умножая экспрессию закодированного антигена. Использование *Salmonella enterica* в качестве носителя ДНК позволяет осуществить прямую доставку в лимфоидную ткань кишечника и выступает в роли мощного стимулятора врожденного иммунитета. В связи с этим перспективным является применение комбинации двух данных способов доставки ДНК-вакцин. Для оценки влияния указанных свойств на усиление активации иммунокомпетентных клеток в ответ на вакцинацию использовали конструкции, кодирующие нейробластома-ассоциированные антигены Survivin и Phox2b.

**Ключевые слова:** ДНК-вакцина, иммуногенность, нейробластома, Survivin, Phox2b, *Salmonella*, полиэтиленимин.

**Адрес для корреспонденции:** М.В. Стёганцева  
223053 Беларусь, Боровляны, ул. Фрунзенская, 43  
Республиканский научно-практический центр детской онкологии,  
гематологии и иммунологии  
E-mail: stsegantsevam@gmail.com

УДК 616.831-006.487-085.375:577.213.32

Низкая эффективность противоопухолевого иммунитета обусловлена слабой реактивностью иммунных клеток по отношению к опухолевым антигенам. ДНК-вакцинация позволяет преодолеть толерантность к собственным антигенам, а за счет дополнительных компонентов простимулировать иммунный ответ [13]. Данный метод иммунотерапии является самым безопасным и простым в использовании. Принцип действия ДНК-вакцины заключается в проникновении плазмидной ДНК в ядро клетки и задействовании ее транскрипционного аппарата для экспрессии закодированного антигена без интеграции в геном [1]. Таким образом, увеличивается презентация специфичных для опухолевых клеток пептидов в комплексе с МНС-I и МНС-II класса благодаря феномену кросс-презентации [15]. Эти события способствуют активации Т-клеточного иммунного ответа против таргетного антигена. Участки неметилированного CpG в плазмидной ДНК активируют факторы врожденного иммунитета за счет взаимодействия с TLR9 [9]. Дополнительные компоненты конструкции могут быть представлены бактериальными или вирусными белками, чтобы обеспечить поддержку CD4<sup>+</sup> Т-хелперов 1-го типа (Th1) [14]. Основной проблемой является высокая степень деградации плазмидной ДНК в межклеточном пространстве, что значительно сокра-

щает количество молекул, достигающих ядра. Для защиты конструкций от разрушительного действия вне- и внутриклеточных ферментов и усиления иммуногенности могут быть использованы различные синтетические и бактериальные носители.

Среди синтетических носителей выделяется полиэтиленимин (ПЭИ) как наиболее исследуемый и перспективный катионный полимер. В экспериментах как *in vitro*, так и *in vivo* установлено, что конъюгирование ПЭИ с плазмидной ДНК многократно увеличивает процент трансфекции модельных клеточных линий [10]. Это обусловлено тем, что ПЭИ образует с ДНК очень компактный положительно заряженный комплекс, который недоступен для действия нуклеаз, облегчает эндоцитоз, а также блокирует литическую активность эндолизосомы за счет регулирования pH и т. д. [5]. Все это прокладывает плазмидной ДНК прямой путь к ядру клетки. Учитывая искусственную природу ПЭИ, необходим подбор оптимального соотношения с ДНК для минимизации цитотоксического эффекта полимера [8].

Еще одним способом защиты плазмидной ДНК может быть использование бактериальных клеток, в частности *Salmonella enterica*. Для вакцинации применяют живые аттенуированные бактерии, которые благодаря особенностям патогенеза доставляют ДНК-вакцину в

лимфоидную ткань, ассоциированную с кишечником [6]. Бактерии стимулируют врожденную иммунную систему, предоставляя множество патоген-ассоциированных молекулярных паттернов. Кроме того, бактериальная клетка служит защитной капсулой для молекулы ДНК в процессе транспортировки.

В качестве предмета исследования была выбрана нейробластома, так как она является самой частой солидной опухолью детского возраста. Эффективное лечение III и IV стадий нейробластомы остается серьезной проблемой детской онкологии, прогноз остается неблагоприятным даже после высокодозной химиотерапии и аутологичной трансплантации гематопозитических стволовых клеток [3]. Только развитие новых альтернативных стратегий лечения, в том числе иммунотерапии, являются реалистичным путем улучшения результатов лечения этого заболевания.

В данном исследовании для ДНК-вакцинации использовали два антигена с разной специфичностью при нейробластоме. Survivin (BIRC5) – ген, кодирующий белок из семейства ингибиторов апоптоза. Он является опухоль-ассоциированным антигеном, экспрессия которого повышена при нейробластоме и других солидных опухолях. При этом экспрессия данного гена отмечена и в здоровых тканях. Он играет роль в функционировании ряда клеток, среди которых Т-лимфоциты, клетки-предшественники гемопоэза, эндотелиальные клетки, клетки печени и др. [12]. Второй антиген представлен геном *phox2b*, кодирующим транскрипционный фактор, который способствует формированию нейронов и регулирует процесс их дифференцировки. Это нейробластома-специфический антиген, так как его экспрессия в норме характерна только для эмбриональной стадии развития и является маркером злокачественной низкодифференцированной нейробластомы [2].

Целью данного исследования было определить иммунологическую эффективность ДНК-вакцинации с различными опухолевыми антигенами при использовании ПЭИ и/или *S. enterica*.

## Материалы и методы

Приготовление культуры *S. enterica*. В эксперименте использовали аттенуированный штамм *Salmonella enterica* serovar *tiphimurium* (SE). Ауксотрофный мутант был получен путем транспозонного мутагенеза двух генов *agoA* и *guaB*. Плазмида (ДНК-вакцина) была введена в бактериальные клетки методом электропорации. Позитивные клоны культивировали 12–18 часов в среде LB при +37°C и постоянном помешивании. Затем клетки отмывали физиологическим раствором 2–3 раза, осаждали и из 1 мл клеточной суспензии готовили 8 десятикратных разведений, каждое из которых (по 100 мкл) высаживали на чашки Петри и культивировали в течение ночи в термостате. По количеству колониеобразующих единиц (КОЕ) на чашках Петри определяли концентрацию бактерий в исходной культуре. Для вакцинации использовали  $10^8$  клеток в 500 мкл физиологического раствора [7].

Дизайн эксперимента. Объектом исследования послужили 39 мышей (10 самок и 29 самцов) линии

C57Bl/6 в возрасте 8–10 недель. ДНК-вакцина на основе вектора для экспрессии включала антигены Survivin или Phox2b с лидерным пептидом вначале, соединенные через короткий линкер с геном капсидного белка вируса X картофеля (PVXCP). На нулевой день мыши получали внутримышечную инъекцию ДНК-вакцины, конъюгированной с ПЭИ молекулярной массой 20 кДа, в массовом соотношении 1:1 и/или интрагастрально суспензию сальмонеллы в дозе  $10^8$  клеток на 500 мкл раствора. Через 14 дней мышей умерщвляли и проводили оценку иммунного ответа. Эксперимент включал четыре группы животных на каждый из двух антигенов: плацебо (инъекция «пустого» вектора), ДНК-ПЭИ, ДНК-SE и совместное применение ДНК-ПЭИ и ДНК-SE. Каждая группа включала 3–6 мышей.

Цитотоксический тест. В качестве опухолевой модели использовали клеточную линию мышиной нейробластомы NB41A3. Клетки культивировали в среде F10 с содержанием 10% ЭТС, 1% пенициллин/стрептомицин, 1% L-глутамин. Изъятую в стерильных условиях мышиную селезенку гомогенизировали и пропускали через фильтр 40 мкм. Спленоциты инкубировали в RPMI с содержанием 10% ЭТС, 1% пенициллина/стрептомицина, 1% глутамин, 50 мкМ бета-меркаптоэтанол, 100 МЕ/мл ИЛ-2. Соотношение эффекторы:мишени составляло 25:1, 10:1. К клеточной суспензии спленоцитов добавляли NB41A3, окрашенные красителем CFSE, и инкубировали 18 ч.

Затем все клетки окрашивали витальным красителем пропидиум йодидом и инкубировали не более 5 мин. Анализ проводили в дублях. Процент лизиса клетками мишеней определяли методом проточной цитофлуориметрии на анализаторе FC500 (Beckman Coulter, США).

Иммуноферментный анализ. Сыворотку получали путем центрифугирования периферической крови, набранной из сердца, и хранили при –80°C. 96-луночный планшет (Grainer Bio-One, США) покрывали белком PVXCP в объеме 100 мкл и инкубировали в течение ночи. Планшет отмывали раствором PBS 0,05% Tween. Сыворотку тестировали в разведениях 1:100 и 1:200. Антитела, связавшиеся с иммобилизованным антигеном, детектировали с помощью козьих антимышиных IgG<sup>+</sup>IgM антител, меченных пероксидазой хрена (Thermo Fisher, США). В качестве стоп-реагента использовали раствор тетраметилбензидина. Экспериментальные и контрольные образцы ставили в дублях. В качестве калибратора использовали пошаговые разведения сыворотки крови кролика, иммунизированного белком PVXCP. Каждому разведению присваивали определенное количество условных единиц (УЕ).

ELISPOT. Интенсивность продукции мышинного гамма-интерферона (ИФН $\gamma$ ) определяли методом ELISPOT с помощью набора BDTM ELISPOT mouse IFN- $\gamma$  ELISPOT Set (BD Biosciences, США). Анализ проводили в дублях. В качестве положительного контроля использовали фитогемагглютинин (конечная концентрация 5 мкг/мл). Для стимуляции спленоцитов использовали белок PVXCP (10 мкг/мл) и пептидную библиотеку (ПБ) для белков Survivin и Phox2b (10 мкг/мл).

Пептиды длиной в среднем 15 аминокислот, включающие одновременно эпитопы МНС-I и II классов, подбирали по степени аффинности к молекулам МНС с помощью программ SIFPEITHI и BIMAS. Спленоциты брали в количестве 250 тыс. на лунку. Результаты детектировали с помощью CTL ImmunoSpot® S5 UV Analyzer (C.T.L., США).

Статистический анализ данных проводили на базе программ Statistica 7.0 и GraphPad Prism 6.0. Различия между группами оценивали по Манну-Уитни.

## Результаты и обсуждение

Иммуногенность конъюгата с ПЭИ. Для оценки иммуногенности вакцин использовали основные тесты на клеточный и гуморальный иммунитет. Клеточный иммунитет оценивали по цитотоксической активности (ЦТА) мышиных спленоцитов против клеточной линии мышиной нейробластомы NB41A3, которая характеризуется высокой экспрессией генов *survivin* и *phox2b*; и уровню продукции интерферона гамма (ИФН $\gamma$ ) как основного маркера специфического Th1-опосредованного иммунного ответа. Гуморальный иммунитет характеризовали по продукции антител классов IgM и IgG.

По результатам проведенной вакцинации мышей установлено, что конъюгирование ДНК-вакцины с ПЭИ приводит к достоверному увеличению специфического лизиса клеток-мишеней при использовании в качестве антигена как гена *survivin* ( $p=0,02$ ), так и гена *phox2b* ( $p<0,05$ ) по сравнению с группой плацебо (рис. 1). Базовый уровень ЦТА в группе, получавшей «пустой» вектор, обусловлен активностью NK-клеток, в то время как в вакцинированных группах в лизисе клеток нейробластомы участвуют активированные CD8<sup>+</sup> цитотоксические Т-лимфоциты (ЦТЛ). Также при вакцинации Phox2b выявлено более стойкое увеличение анализируемого параметра по сравнению с Survivin.

Уровень продукции ИФН $\gamma$  у мышей, вакцинированных с ПЭИ, в ответ на стимуляцию белком PVXCP или соответствующую вакцине пептидную библиотеку не отличался достоверно от группы контроля (рис. 2, 3). У мышей, получавших вакцину с Survivin, после инкубации спленоцитов с пептидами показатели выросли в 1,3 раза (на 25%) по сравнению с группой плацебо, а у мышей, получавших вакцину с Phox2b – в 8,4 раза. Ответ

на стимуляцию белком PVXCP в среднем вырос в 2 раза в обоих случаях.

По результатам оценки гуморальной составляющей индуцируемого иммунного ответа установлено, что уровень анти-PVXCP антител в сыворотке крови мышей, вакцинированных Survivin в среднем на 25% больше по сравнению с теми, кто получал пустой вектор ( $p>0,05$ ), а в группе, получавшей Phox2b – уровень не изменился.

Суммарное увеличение всех оцениваемых показателей, свидетельствует о том, что конъюгирование ДНК-вакцины с ПЭИ усиливает её иммуногенность. ПЭИ не оказывает самостоятельного иммуностимулирующего или иммуномодулирующего воздействия. Возрастание эффективности иммунизации в данном случае обусловлено предохранением молекул ДНК от разрушения, а также значительно лучшей проницаемостью цитоплазматической и ядерной мембран (трансфекция). Более высокая продукция ИФН $\gamma$  в ответ на стимуляцию PVXCP по сравнению с опухолевым антигеном, вероятно, связана с вирусной природой белка, а также возможностью естественной сенсибилизации, предшествующей вакцинации. Продукция ИФН $\gamma$  в тесте ELISPOT является точным количественным показателем клеточного иммунитета [4]. Пептидные библиотеки используемых антигенов включали все основные эпитопы как МНС-I, так и МНС-II классов, поэтому в реакции выделения ИФН $\gamma$  участвуют как CD8<sup>+</sup> ЦТЛ, так и CD4<sup>+</sup> Т-хелперы I типа.

Иммуногенность вакцины с *S. enterica*. В течение периода мониторинга после пероральной вакцинации мышей плазмидной ДНК, встроенной в аттенуированный штамм *S. enterica*, не было зафиксировано каких-либо признаков развития заболевания (ухудшение состояния здоровья, потеря массы тела, расстройство пищеварения, поведенческие отклонения и др.). При этом у вакцинированных животных наблюдается статистически значимое увеличение цитотоксической активности спленоцитов при применении каждого из антигенов. В случае Survivin ЦТА было достоверно выше не только по сравнению с контрольной группой (пустая SE, данные на рисунке не представлены) ( $p<0,01$ ), но и по сравнению с вакциной в комплексе с ПЭИ ( $p=0,01$ ) при соотношении эффекторы-мишени 10:1 (рис. 1А). Схожие различия наблюдаются при соотношении 30:1. Аналогичные результаты получены при вакцинации

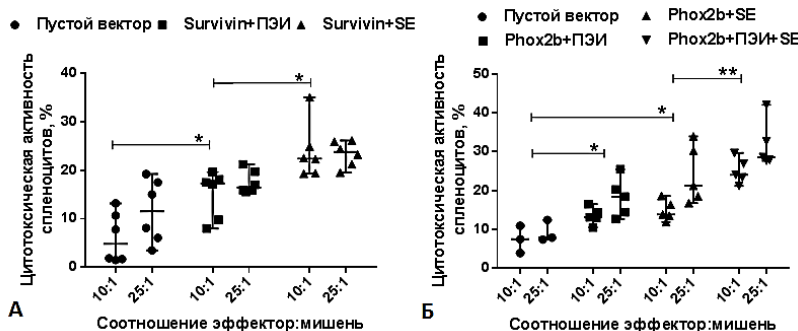


Рис. 1. Цитотоксическая активность спленоцитов (медиана±мин/макс) у мышей, вакцинированных пустым вектором, вакциной (Survivin – А, Phox2b – Б), конъюгированной с ПЭИ. \* $p<0,05$ , \*\* $p<0,01$ .

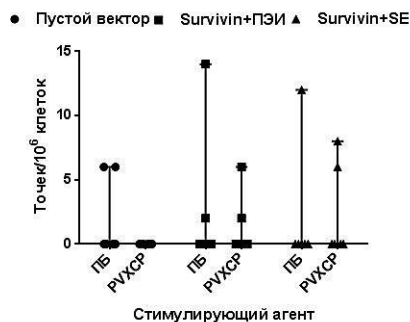


Рис. 2. Уровень продукции интерферона гамма (медиана±мин/макс) у мышей, вакцинированных пустым вектором или вакциной Survivin, конъюгированной с ПЭИ. ПБ – пептидная библиотека.

мышей с антигеном Phox2b (рис. 1Б). В данном случае ЦТА после пероральной вакцинации с Phox2b достоверно выше по сравнению с контролем ( $p < 0,05$ ), но не отличается от таковой при использовании ПЭИ. Отличий в ЦТА между контрольными группами, получавшими пустой вектор и пустую SE, не обнаружено. Это свидетельствует об отсутствии неспецифической активации киллерных клеток бактериями.

Спленоциты мышей, получавших вакцину Phox2b<sup>+</sup>SE, характеризовались увеличением интерферон-продуцирующей активности по сравнению с контрольной группой после активации соответствующей пептидной библиотекой ( $p = 0,01$ ) (рис. 3). Достоверных различий в продукции ИФН $\gamma$  после стимуляции с пептидной библиотекой Survivin в вакцинированных и контрольных группах не обнаружено (рис. 2). Контрольные группы (пустой вектор и SE) также не отличались между собой по уровню ИФН $\gamma$ .

Совокупная продукция антител классов IgM и IgG у мышей, получавших пероральную форму вакцины Survivin<sup>+</sup>SE была в 1,9 раз выше, чем в контроле и в 1,4 раза – по сравнению с группой, вакцинированной конъюгатом с ПЭИ. При использовании Phox2b в качестве опухолевого антигена, продукция антител в группе, вакцинированной Phox2b<sup>+</sup>SE, была в 1,5 раза выше, чем в контроле, и в 3–4 раза выше, чем у мышей, получав-

ших Phox2b<sup>+</sup>ПЭИ ( $p > 0,05$ ). Следует отметить, что титр антител в контрольной группе животных, получавших плацебо контроль SE, был почти в два раза выше, чем таковой в другой контрольной группе, вакцинированной пустым вектором без антигена (170 против 327 УЕ/мл). Это может свидетельствовать о неспецифической активации антителообразования бактериями. Следует отметить слабый уровень антительного ответа во всех ветвях эксперимента. Достоверным гуморальным ответом принято считать повышение специфического титра в 3–4 раза. Преобладание клеточного над гуморальным ответом при противоопухолевой вакцинации расценивается как преимущество, указывающее на баланс в сторону ЦТЛ и Th1 над Th2 ответом.

Показано, что вакцина с сальмонеллой характеризуется увеличением всех исследуемых параметров, по сравнению, как с плацебо контролем, так и с конъюгатом вакцина+ПЭИ. Это обусловлено рядом причин, среди которых непосредственная доставка в ассоциированную с кишечником лимфоидную ткань, взаимодействие с TLR и другими паттерн-распознающими рецепторами. Бактерии проникают в М-клетки в эпителии кишечника, а затем поглощаются макрофагами. В макрофагах происходит высвобождение плазмидной ДНК, ее процессинг и презентация закодированных антигенов лимфоцитам [11]. При этом активация Т-лимфоцитов в ответ на опухолевый антиген не является перекрестной или не специфически простимулированной бактериями, так как при вакцинации «пустой» сальмонеллой отличий с «пустым» вектором по всем анализируемым показателям не найдено.

Наилучшие результаты иммуногенности получены при комбинировании двух вариантов доставки вакцины, а именно внутримышечная вакцинация с ПЭИ и пероральная вакцинация с SE (проведено только для Phox2b). Показатели ЦТА достоверно выше по сравнению с группой плацебо ( $p < 0,01$ ) и по сравнению с каждым видом вакцинации отдельно ( $p < 0,05$ ) (рис. 1Б). После стимуляции пептидной библиотекой Phox2b наблюдается достоверное увеличение в синтезе ИФН $\gamma$  по сравнению с пустым вектором. В случае стимуляции спленоцитов белком PVXCP статистически значимые различия отмечены в сравнении с группой, получавшей

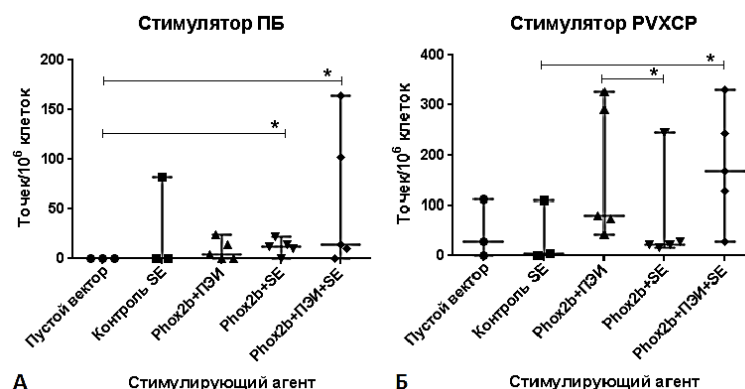


Рис. 3. Уровень продукции интерферона гамма (медиана±мин/макс) у мышей, вакцинированных пустым вектором или вакциной Phox2b, конъюгированной с ПЭИ. ПБ – пептидная библиотека, \* $p < 0,05$ .

пустую SE (рис. 3). Суммарный титр антител классов IgM и IgG сопоставим с таковым после вакцинации Phox2b<sup>+</sup>SE. ПЭИ и SE усиливают иммуногенность ДНК-вакцин разными способами. Комбинированное применение двух вариантов вакцинации оказывает бустерный эффект, что и приводит к увеличению всех иммунологических параметров по сравнению с каждой из вакцин в отдельности.

По результатам исследования показано, что применение как полимерного носителя ДНК-вакцины (ПЭИ) так и пероральная доставка ДНК-вакцины в составе бактерий *S. enterica* обеспечивают развитие поствакци-

нального иммунитета у мышей. Однако эффективность иммунизации с помощью бактерий значительно превосходит таковую у синтетического носителя за счет непосредственной доставки в лимфоидную ткань кишечника и стимуляцию компонентов врожденного иммунитета. Комбинирование обоих методов показало максимальную иммунологическую эффективность.

Данная тема требует дальнейших исследований на опухолевой модели с целью оценки эффективности ДНК-вакцинации в условиях опухолевой нагрузки. Необходимо дальнейший поиск антигенов, наиболее специфичных и иммуногенных для конкретного вида опухоли.

## Литература

1. Стёганцева М.В., Мелешко А.Н. Противораковая ДНК-вакцинация: принцип и возможности метода // *Медицинская иммунология*. 2017. Том 19. № 2. С. 145–156.
2. Alam G., Cui H., Shi H., Yang L., Ding J., Mao L., Maltese W.A., Ding H.F. MYCN promotes the expansion of phox2b-positive neuronal progenitors to drive neuroblastoma development // *Am J Pathol*. 2009. Vol. 175. # 2. P. 856–866.
3. Brodeur G.M. Neuroblastoma: biological insight into a clinical enigma // *Nat Rev Cancer*. 2003. Vol. 3. # 3. P. 203–16.
4. Chambers I.R., Cone T.R., Oswald-Richter K., Drake W.P. enzyme-linked immunospot assay (ELISPOT): Quantification of Th-1 cellular immune responses against microbial antigens // *J Vis Exp*. 2010. Vol. 45. P. 2221–2225.
5. Demeneix B., Behr, J.P., Polyethylenimine (PEI) // *Adv. Genet*. 2005. Vol. 53. P. 217–230.
6. Fàbrega A., Vila J. *Salmonella enterica* serovar typhimurium skills to succeed in the host: virulence and regulation // *Clin. Microbiol. Rev*. 2013. Vol. 26. # 2. P. 308–341.
7. Fest S., Huebener N., Bleeke M., Durmus T., Stermann A., Woehler A., Baykan B., Survivin minigene DNA vaccination is effective against neuroblastoma // *Int. J. Cancer*. 2009. Vol. 125. P.104–114.
8. Grant E.V., Thomas M., Fortune J., Klibanov A.M., Norman L. Letvin Enhancement of plasmid DNA immunogenicity with linear polyethylenimine // *Eur. J. Immunol*. 2012. Vol. 42. P.2937–2948.
9. Hemmi H., Takeuchi O., Kawai T. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA // *Nature*. 2000. Vol. 408. # 6813. P. 740–745.
10. Longo P.A., Kavran J.M., Kim M.S., Leahy D.J. Transient mammalian cell transfection with polyethylenimine (PEI) // *Methods Enzymol*. 2013. Vol. 529. P 227–240.
11. McSorley S.J. Immunity to intestinal pathogens: lessons learned from Salmonella // *Immunol Rev*. 2014. Vol. 260. # 1. P. 168–182.
12. Mobahat M., Survivin as a Preferential Target for Cancer Therapy // *Int. J. Mol. Sci*. 2014. Vol. 15. # 2. P. 2494–2516.
13. Moreno S., Timón M. DNA vaccination: an immunological perspective // *Inmunología*. 2004. Vol. 23. # 1. P. 41–55.
14. Savelyeva N., Allen A., Chotprakaikiat W., Harden E., Jobsri J., Godeseth R., Wang Y., Stevenson F., Ottensmeier C. Linked CD4 T Cell Help: broadening immune attack against cancer by vaccination // *Curr Top Microbiol Immunol*. 2017. Vol. 405. P. 123–143.
15. Shedlock D.J., Weiner D.B. DNA vaccination: antigen presentation and the induction of immunity // *J Leukoc Biol*. 2000. Vol. 68. # 6. P. 793–806.

## Immunological effectiveness of DNA-vaccination against neuroblastoma in combination with polyethylenimin and *Salmonella enterica*

**M.V. Stegantseva, V.A. Shinkevich, E.M. Tumar, A.N. Meleshko**

Republican Scientific and Practical Center of Children's Oncology, Hematology and Immunology, Borovlyany, Belarus

Low reactivity of immune cells to tumor antigens is one of the reasons for the ineffectiveness of antitumor immunity. DNA vaccination allows overcome tolerance to its own antigens and induces an immune response. Various synthetic and bacterial carriers can be used to enhance immunogenicity. Conjugation of the DNA vaccine with polyethylenimine protects DNA molecules from degradation and increases the efficiency of cell transfection, thereby multiplying the expression of the encoded antigen. *Salmonella enterica* as a bacterial carrier delivers plasmid DNA directly to the intestine lymphoid tissue and acts as a powerful stimulant of innate immunity. In this regard, it is promising to use a combination of these two methods of DNA vaccine delivery. Genetic constructs encoding the neuroblastoma-associated antigens Survivin and Phox2b were used to evaluate the immunological effect of these carriers.

**Key words:** DNA-vaccine, immunogenicity, neuroblastoma, Survivin, Phox2b, *Salmonella*, polyethylenimin.

## ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ CXCL12 НА ХЕМОТАКСИС КЛЕТОК МИЕЛОМОНОБЛАСТНОГО ЛЕЙКОЗА И ЭКСПРЕССИЮ ГЕНА TLR4

А.Б. Филина<sup>1</sup>, О.А.Свитич<sup>1</sup>, Ю.И. Аммур<sup>1</sup>, А.К. Голенков<sup>2</sup>,  
Е.Ф. Клинушкина<sup>2</sup>, В.В. Зверев<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова;

<sup>2</sup>Московский областной научно-исследовательский клинический институт  
им. М.Ф. Владимирского, Москва

В настоящее время онкологические заболевания являются одной из важнейших социальных проблем. В связи с этим учеными всего мира в течение последних десятилетий проводится разработка новых подходов к терапии опухолей. Одно из таких направлений связано с воздействием на факторы врожденного иммунитета, одними из которых TLRs и хемокины. Наиболее обсуждаемыми на данный момент являются такие участники онкогенеза как хемокин CXCL12 и рецептор TLR4. Проведено много работ, направленных на изучение данных факторов врожденного иммунитета в опухолевой прогрессии, однако на данный момент нет работ, направленных на изучение взаимовлияния хемокинов и TLRs друг на друга. В представленной работе приведены данные по влиянию CXCL12 на хемотаксис как здоровых так клеток, выделенных от пациентов с миеломонобластным лейкозом до и после химиотерапии цитозаром и даунорубицином, а также влияние данного хемокина на экспрессию TLR4.

**Ключевые слова:** хемотаксис, TLRs, TLR4, CXCL12, миеломонобластный лейкоз, метастазирование, острый миелоидный лейкоз.

**Адрес для корреспонденции:** А.Б. Филина  
105064 Москва, Малый Казенный переулок, 5а  
НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова  
E-mail: byzonka@yandex.ru

УДК 612.017.11:616-006.04 577.112 Сит:612.017.11

В настоящее время онкологические заболевания являются одной из важнейших социальных проблем. По данным ВОЗ по всему миру прогнозируется порядка двадцати миллионов случаев онкологических заболеваний в год к 2020 г. В связи с этим учеными всего мира в течение последних десятилетий проводится разработка новых подходов к терапии опухолей. Одно из таких направлений связано с воздействием на факторы врожденного иммунитета, одними из которых являются рецепторы врожденного иммунитета и хемокины.

В конце прошлого века были открыты распознающие структуры врожденного иммунитета TLRs (Toll-like receptors, Toll-подобные рецепторы), которые являются рецепторами для так называемых PAMPs (Pathogen-associated molecular pattern; патоген-ассоциированные молекулярные паттерны) и DAMPs (Damage-associated molecular pattern; молекулярные паттерны, ассоциированные с повреждением). Открытие этих рецепторов способствовало дальнейшим исследованиям, которые активно проводятся последние годы, по влиянию TLRs на развитие опухолевого процесса, так как TLRs экспрессируются не только клетками иммунной системы, но также и другими клетками организма, в большей степени эпителиальными клетками слизистых [1–7]. По данным литературы показана двоякая роль TLR относительно онкогенеза [8, 11]. С одной

стороны активация TLRs на здоровых клетках при хроническом воспалении может быть одним из факторов, косвенно приводящих к озлокачиванию (предотвращение апоптоза и пролиферация опухоли). По данным многочисленных исследований к таким рецепторам относятся TLR4. Показано, что пациенты с колоректальным раком с высоким уровнем экспрессии TLR4 имели более высокий риск прогрессирования заболевания, а у пациентов с высоким уровнем экспрессии TLR4 в клетках рака прямой кишки был рецидив значительно раньше, чем у пациентов с более низким уровнем экспрессии [10]. Также Qingwen Wang провел мета анализ, в котором показал, что TLRs участвуют в онкогенезе, в котором была собрана и проанализирована информация различных исследований по данной тематике. Автор анализа показал, что, несмотря на наличие данных о противоопухолевом эффекте рецепторов TLR4 и TLR7, в большинстве исследований показан проопухолевый эффект этих рецепторов (24 исследования и 2812 пациентов) [16].

Другие сигнальные пути с TLRs приводят к регрессии опухоли или через механизмы апоптоза клеток или через активацию дендритных клеток, NK клеток, цитотоксических Т-лимфоцитов, что приводит к уничтожению опухолевых клеток. Одним из важнейших таких рецепторов является TLR3. Несколько исследований

показали корреляцию TLRs и апоптоза. В качестве примера можно привести данные по стимуляции гепатоцеллюлярной карциномы с помощью поли (I: C), что в свою очередь может способствовать апоптозу путем активации TLR3. Помимо того, что через TLR3 может быть запущен апоптоз опухолевых клеток, возможна активация запрограммированного некроза через этот же рецептор [9, 17].

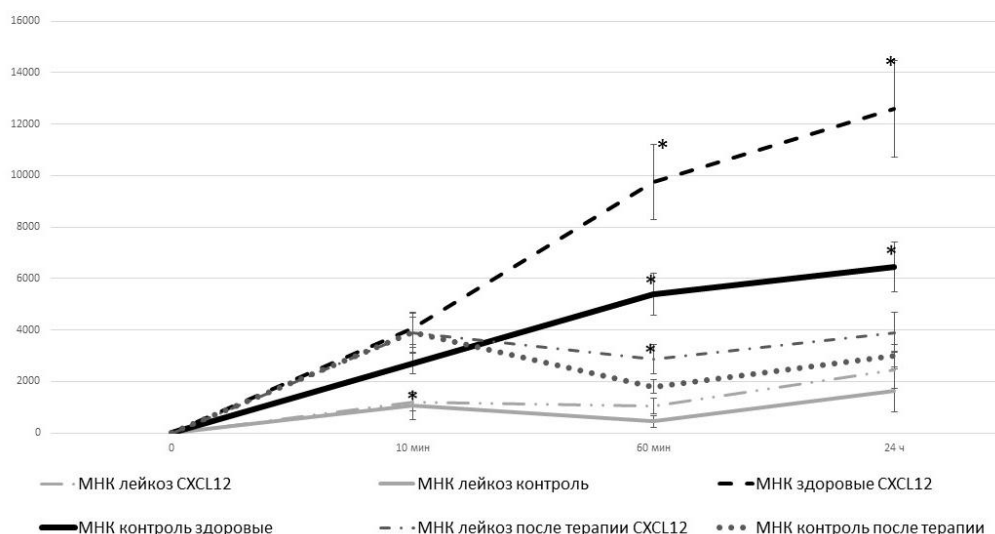
Другими факторами врожденного иммунитета, которые задействованы в развитии опухолевых клеток, являются хемокины. Хемокины в основном принимают участие в ангиогенезе опухоли и метастазировании. Одним из таких важнейших хемокинов является CXCL12. Многочисленные исследования указывают на участие данного хемокина в активной миграции опухолевых клеток и опухолевой прогрессии [8, 14–15]. Однако, данные последних исследования приходили к выводу, что функция данного хемокина неоднозначно. Luke J. Drury с соавторами показали, что в противовес ранним исследованиям об антагонизме CXCR4 и CXCL12, CXCL12 является мощным ингибитором метастазирования колоректального рака и меланомы [12]. L. Hernandez представила данные о том, что активация хемотаксиса клеток рака молочной железы путем воздействия зависит от уровня экспрессии рецепторов CXCR4 и CXCR7. При повышенной экспрессии CXCR4 прогрессия и метастазирование действительно увеличивались, однако повышенная экспрессия CXCR7 приводила к прямо противоположному эффекту [13].

Имеется достаточно много работ о влиянии вышеописанных факторов на онкологические процессы, однако ранее не была изучена возможная взаимосвязь между ними. Таким образом, целью нашей работы было исследование хемотаксиса опухолевых клеток на примере мононуклеарных клеток (МНК), выделенных от пациентов с миеломонобластным лейкозом до и после химиотерапии под воздействием хемокина CXCL12, а также изучение экспрессии TLR4.

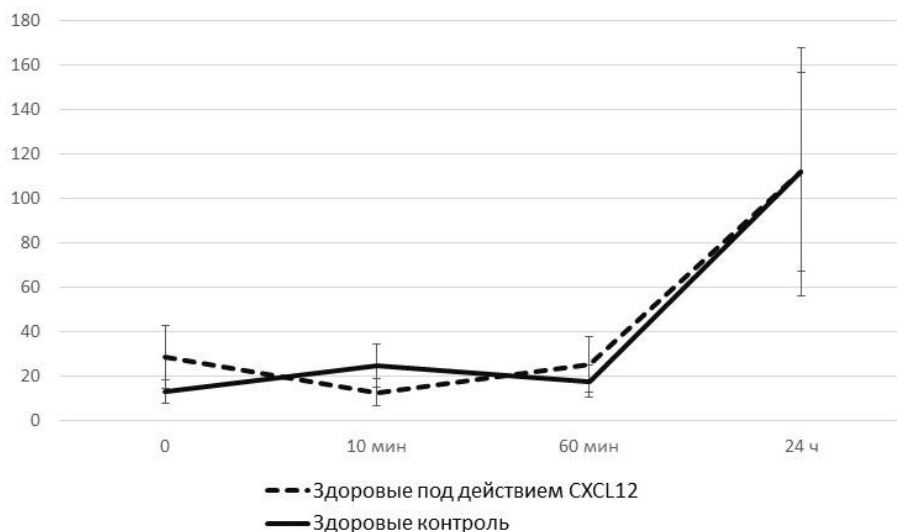
## Материалы и методы

Нами были отобраны здоровые доноры в возрасте 20–40 лет ( $n=10$ ), которые не имели онкологических, аутоиммунных заболеваний, иммунодефицитов в анамнезе, а также инфекционных заболеваний на момент взятия крови для формирования группы контроля. Второй клинической группы были пациенты в возрасте 20–50 лет ( $n=5$ ) с миеломонобластным лейкозом без наличия сопутствующих инфекционных, иммунодефицитных и аутоиммунных заболеваний до и после химиотерапии цитозаром и даунорубицином (пациенты отделения клинической гематологии и иммунотерапии ГБУЗ МО МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского).

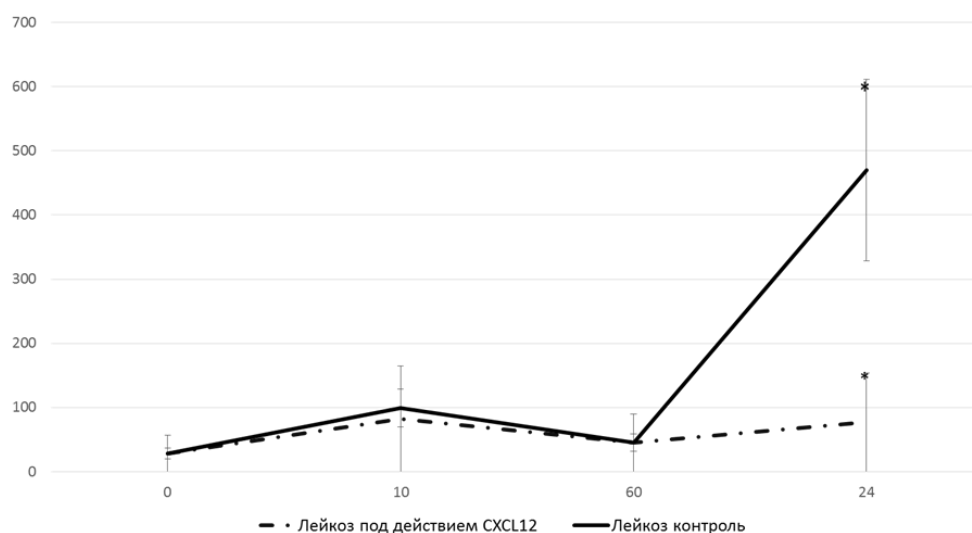
Из периферической крови пациентов всех групп были выделены мононуклеарные клетки (МНК) методом центрифугирования в градиенте плотности Diacoll-1077 (Диа-М, Россия) (метод выделения «ДНК-технология»). Для исследования хемотаксиса использовалась камера Бойдена (фирма MERCK MultiScreen Migration Invasion and Chemotaxis Filter Plate, Германия) с размерами пор 5 и 8 мкм. Агентом для хемотаксиса служили CXCL12 (ThermoFisher, США). Выделение РНК из клеток проводилось с помощью набора «РИБО-сорб» (ИЛС, РФ), далее проводили реакцию обратной транскрипции с помощью «Набора реагентов ОТ-1» (ИЛС, РФ) и ПЦР-РВ («Набор реагентов с SYBR Green1», Синтол, РФ) на амплификаторе ДТпрайм («ДНК-Технология», РФ). Последовательности праймеров для исследования экспрессии TLR4 были получены из GeneBank (NCBI) и синтезированы компанией Синтол (РФ). На первом этапе оценивали количество мигрировавших клеток. Динамику миграции оценивали через 10, 60 мин и через одни сутки. В верхний отсек камеры помещалась взвесь клеток в объеме 60 мкл и количестве  $60 \pm 1 \times 10^3$ . В нижний отсек камеры вносили хемоаттрактант в объеме 175 мкл в концентрации 200 нг/мл (CXCL12). В качестве контроля использовали среду RPMI-1640 (ПанЭко, РФ).



**Рис. 1.** Миграция МНК здоровых доноров, пациентов с миеломонобластным лейкозом до и после химиотерапии. По оси абсцисс – время, через которое проводили измерение мигрировавших клеток. По оси ординат – количество мигрировавших клеток. \*Показатель достоверно отличается от такового в интактных клетках ( $p \leq 0,05$ ).



**Рис. 2.** Динамика экспрессии гена TLR4 под действием хемокина CXCL12 на МНК здоровых доноров. По оси абсцисс – время, через которое проводили измерение мигрировавших клеток. По оси ординат – уровень экспрессии TLR4 (количество копий исследуемого гена относительно экспрессии гена актина).



**Рис. 3.** Динамика экспрессии гена TLR4 под действием хемокина CXCL12 на МНК пациентов с миеломонобластным лейкозом до химиотерапии. По оси абсцисс – время, через которое проводили измерение мигрировавших клеток. По оси ординат – уровень экспрессии TLR4 (количество копий исследуемого гена относительно экспрессии гена актина). \*Показатель достоверно отличается от такового в интактных клетках ( $p \leq 0,05$ ).

Данные представление в количестве мигрировавших клеток в нижний отсек камеры.

На втором этапе исследовалась экспрессия гена TLR4 в контрольных образцах и активированных клетках. Уровень экспрессии оценивали относительно уровня  $\beta$ -актина. Данные представлены в количестве копий гена. Статистический анализ проводили с использованием компьютерной статистической программой BioStat, а также программы Excel. Были использованы непараметрические методы статистики Манна–Уитни.

## Результаты и обсуждение

На первом этапе мы оценивали миграцию МНК здоровых доноров и пациентов с миеломонобластным лейкозом. Миграция мононуклеарных клеток здоровых доноров относительно CXCL12 была достоверно выше миграции контроля 2 раза через 60 мин и 24 ч (рис. 1). Миграция МНК от пациентов с миеломонобластным лейкозом до начала химиотерапии под действием CXCL12 и в контроле не имела достоверных отличий,

однако была ниже миграции клеток здоровых доноров в 7 раз, а динамика хемотаксиса клеток от пациентов после химиотерапии приближается к динамике миграции МНК здоровых доноров, однако так же достоверно отличается в сторону снижения в 2,5 раза (рис. 1).

На втором этапе оценивалась экспрессия TLR4 в МНК от здоровых доноров и пациентов с миеломонобластным лейкозом до и после миграции относительно CXCL12. В группе здоровых доноров достоверных отличий по экспрессии данного рецептора до и после воздействия CXCL12 обнаружено не было (рис. 2). В группе пациентов с миеломонобластным лейкозом до химиотерапии экспрессия TLR4 в активированных клетках в течение часа достоверно не отличалась от экспрессии в неактивированных МНК, однако через сутки экспрессия TLR4 под воздействием CXCL12 снизилась относительно контрольной группы в 4,5 раза. Уровень экспрессии гена TLR4 в опухолевых клетках в контрольной группе через час после миграции выше чем в клетках от здоровых доноров как после стимуляции, так и без нее, что подтверждает вышеописанные теории о возможности использовать данный рецептор как прогностический фактор (рис. 3).

Таким образом, полученные нами данные показывают, что у пациентов с миеломонобластным лейкозом до химиотерапии как спонтанная, так и индуцированная миграционная активность снижена в 7 раз относительно миграции МНК здоровых доноров в течение всего эксперимента. После применения химиотерапии миграционная активность частично восстанавливается. Также наблюдается блокировка индуцибельной экспрессии генов рецептора TLR4 в МНК с миеломонобластным лейкозом.

Влияние вышеописанных факторов врожденного иммунитета в опухолеобразовании неоднозначно. Ранее было упомянуто, что один и тот же рецептор может, как способствовать прогрессии онкологического процесса, так и снижать ее, в зависимости от его происхождения. Скорее всего, влияние как хемокинов, в частности CXCL12, так и TLRs зависит от типа опухоли. Исследования в данной области с изучением более широкого спектра TLRs и рецепторов хемокинов, а также изучение их взаимовлияния, поможет лучше понять патогенез на развитие различных типов опухолей, а также приблизит к персонализации терапии в онкологии.

## Литература

1. Ганковская О.А., Ганковская Л.В., Сомова О.Ю., Зверев В.В. TOLL- подобные рецепторы, распознающие лиганды вируса герпеса // *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2009. № 2. С. 108–111.
2. Григорьева О.Ю. Экспрессия генов врожденного иммунитета при герпесвирусной инфекции // *Прорывные научные исследования как двигатель науки*. Сборник статей международной научно-практической конференции. 2017. С. 127–131.
3. Ковальчук Л.В., Свитич О.А., Ганковская Л.В., Мирониченкова А.М., Ганковский В.А. Роль TOLL- подобных рецепторов в патогенезе инфекционных заболеваний человека // *Курский научно-практический вестник Человек и его здоровье*. 2012. № 2. С. 147–153.
4. Лабжинов П.А., Свитич О.А., Ганковская Л.В., Зверев В.В. Оценка экспрессии генов компонентов врожденного иммунитета в лейкоцитах мышей при действии синтетических лигандов *in vivo* // *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2013. № 6. С. 76–80.
5. Лабжинов П.А. Оценка эффективности влияния синтетических лигандов TLRs на экспрессию генов TLR9 и BD-2 в лейкоцитах мышей BALBc // *Наука и современность*. Сборник статей Международной научно-практической конференции. 2016. С. 9–12.
6. Лабжинов П.А. TLR-опосредованная активация экспрессии генов TLR9 И BD-2 *in vivo* // *Новая наука: история становления, современное состояние, перспективы развития*. Сборник статей международной научно-практической конференции. 2017. С. 30–35.
7. Макаров О.В., Бахарева И.В., Ганковская Л.В., Романовская В.В., Ганковская О.А. TOLL-подобные рецепторы в генезе невынашивания беременности // *Акушерство и гинекология*. 2008. № 2. С. 22–27.
8. Свитич О.А., Филина А.Б., Давыдова Н.В., Ганковская Л.В., Зверев В.В. Роль факторов врожденного иммунитета в процессе опухолеобразования. *Медицинская иммунология*. 2018. Т. 20. № 2. С. 151–162.
9. Bianchi F, Pretto S., Tagliabue E., Balsari A., Sfondrini L. Exploiting poly(I:C) to induce cancer cell apoptosis // *Cancer Biology & Therapy*. 2017. Vol. 18. #10. P. 747–756.
10. Cammarota R, Bertolini V, Pennesi G, et al. The tumor microenvironment of colorectal cancer: stromal TLR-4 expression as a potential prognostic marker // *Journal of Translational Medicine*. 2010. Vol. 8
11. Cen X, Liu S, Cheng K. The Role of Toll-Like Receptor in Inflammation and Tumor Immunity // *Frontiers in Pharmacology*. 2018. Vol.9
12. Drury LJ, Ziarek JJ, Gravel S, et al. Monomeric and dimeric CXCL12 inhibit metastasis through distinct CXCR4 interactions and signaling pathways // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011. Vol. 108(43)
13. Hernandez L., Magalhaes M.A., Coniglio S.J., Condeelis J.S., Segall J.E. Opposing roles of CXCR4 and CXCR7 in breast cancer metastasis // *Breast Cancer Research*. 2011. Vol. 13. #6. R128. doi: 10.1186.
14. Nagarsheth N., Wicha M.S., Zou W. Chemokines in the cancer microenvironment and their relevance in cancer immunotherapy // *Nature Reviews Immunology*. 2017. Vol. 17. # 9. P.559–572.
15. Sun X, Cheng G, Hao M, et al. CXCL12/CXCR4/CXCR7 Chemokine Axis and Cancer Progression // *Cancer metastasis reviews*. 2010. Vol. 29(4). P. 709–722.
16. Wang Q., Zhang X., Xiao T., Pan C., Liu X., Zhao Y. Prognostic role of Toll-like receptors in cancer: a meta-analysis // *Therapeutics and Clinical Risk Management*. 2018. Vol. 14. P. 1323–1330.
17. Yuan M.-M., Xu Y.-Y., Chen L., Li X.-Y., Qin J., Shen Y. TLR3 expression correlates with apoptosis, proliferation and angiogenesis in hepatocellular carcinoma and predicts prognosis // *BMC Cancer*. 2015. Vol. 15. 245. doi: 10.1186/s12885-015-1262-5.

## The effect of CXCL12 on the chemotaxis of myelomonoblastic leukemia cells and the TLR4 expression

A.B. Filina<sup>1</sup>, O.A. Svitich<sup>1</sup>, Yu.I. Ammur<sup>1</sup>, A.K. Golenkov<sup>2</sup>,  
E.F. Klinushkina<sup>2</sup>, V.V. Zverev<sup>1</sup>

<sup>1</sup>I.I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera;

<sup>2</sup>Moscow Regional Research and Clinical Institute "MONIKI", Moscow, Russia

At present, oncological diseases are one of the most important social problems. In this connection, scientists all over the world have been developing new approaches to tumor therapy during last decades. One of these areas is associated with the impact on the factors of innate immunity, one of which is TLRs and chemokines. The most discussed at the moment are such participants of oncogenesis as the chemokine CXCL12 and the TLR4 receptor. A lot of works have been done to study these factors of innate immunity in the tumor progression, but at the moment there are no studies aimed at studying the mutual influence of chemokines and TLRs on each other. Thus, in our work, we tried to study the effect of CXCL12 on the chemotaxis of both healthy cells isolated from patients with myelomonoblastic leukemia before and after chemotherapy with cytosar and daunorubicin according, and the effect of this chemokine on the expression of TLR4.

**Key words:** chemotaxis, TLRs, TLR4, CXCL12, myelomonoblastic leukemia, metastasis, acute myeloid leukemia.

## Календарь конференций

2–5 февраля 2019

Сингапур

### XIII ВСЕМИРНЫЙ КОНГРЕСС ПО АСТМЕ, ХОБЛ И РЕСПИРАТОРНОЙ АЛЛЕР

29 июня – 2 июля 2019

Санкт-Петербург, Россия

### XII ВСЕМИРНЫЙ КОНГРЕСС ПО АСТМЕ, АЛЛЕРГИИ И ХОБЛ

WWW.ISIR.RU

## ИММУНОПАТОФИЗИОЛОГИЯ ВОСПАЛЕНИЯ

В.А. Черешнев<sup>1,2</sup>, Б.Г. Юшков<sup>1</sup>, М.В. Черешнева<sup>1</sup>, Т.В. Гаврилова<sup>2</sup>  
А.Ю. Гаврилова<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Институт иммунологии и физиологии, Екатеринбург

<sup>2</sup>Пермский государственный медицинский университет им. Е.А. Вагнера, Пермь

<sup>3</sup>Национальный исследовательский университет «Высшая школа экономики»,  
Москва

В ответ на повреждение различной природы в организме развивается комплекс местных и системных защитных реакций. К первым можно отнести воспалительную реакцию поврежденной ткани, а также локальный иммунный ответ на внедрение генетически чужеродных антигенов. В свою очередь, ко вторым – стрессорную реактивность нейроэндокринной системы, изменение гемопозитической функции костного мозга, развитие генерализованного иммунного ответа на территории различных лимфоидных органов и продукции белков острой фазы.

**Ключевые слова:** системное воспаление, альтерация, повреждение, цитокины, математическое моделирование.

**Адрес для корреспонденции:** Академик В.А. Черешневу  
620049 Екатеринбург, ул. Первомайская, 106.  
Институт иммунологии и физиологии РАН  
УДК 616-002.1+616-002.2

Воспаление есть «ключевой» общепатологический и одновременно адаптационно-приспособительный биологический процесс, обусловленный реакцией защитных механизмов организма на местное повреждение. Ещё И.И. Мечников (1883) определил суть воспаления как протективную концентрацию фагоцитов в зоне альтерации. При этом у человека мобилизация фагоцитов крови невозможна без воспалительной реакции микрососудов, различных белковых систем плазмы крови, мастоцитов и других периваскулярных мезенхимальных клеток. В целом, воспаление является преимущественно локальным процессом [7, 11], в основе которого лежит местное повреждение. Именно на местном уровне, ассоциированном с очагом воспаления, проявляются его атрибутные признаки: гиперемия, локальное повышение температуры, отёк, боль, нарушение функции повреждённого органа. В их основе лежат молекулярно-клеточные механизмы воспаления [1], а именно:

- морфофункциональная перестройка эндотелиоцитов 2-го типа посткапиллярных венул и коагуляция в них крови, адгезия и трансэндотелиальная миграция из пост-капиллярных венул (ПКВ) лейкоцитов;
- активация комплемента, кининогенез, вазодилатация артериол, дегрануляция мастоцитов;
- дальнейшая активация в зоне повреждения «воспалительных» клеток с развитием феноменов оксидантно-стресса и «протеиназного взрыва».

Триггеры воспаления, а именно: продукты тканевой деградации, липополисахариды грамотрицательных бактерий, иммунные комплексы и другие инициаторные факторы активируют, как правило, сразу несколько ба-

зисных составляющих программы воспаления. При этом выраженная активация любого звена может «включить» всю систему воспалительной реактивности. Регуляторными посредниками для этой взаимообразной активации служат эйкозаноиды, биогенные амины, продукты активации систем гемостаза и комплемента, некоторые свободные радикалы и многие другие медиаторы воспаления.

Особое место среди них занимает цитокиновая сеть [2–3, 12], которая контролирует практически все процессы развития иммунной и воспалительной реактивности. Основными продуцентами цитокинов являются Т-клетки и «воспалительные» макрофаги, а также в той или иной степени другие виды лейкоцитов, эндотелиоциты ПКВ, тромбоциты и многие типы стромальных клеток.

Цитокины приоритетно действуют в очаге воспаления и на территории реагирующих лимфоидных органов [8, 12]. Однако при выраженном воспалении некоторые виды цитокинов: ФНО $\alpha$ , ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-10, ТФР $\beta$ , ИФН $\gamma$  (при вирусных инфекциях), – могут накапливаться в крови в достаточном количестве для реализации своих длиннодистантных эффектов. В этом случае они наряду с другими эндокринными факторами инициируют развитие воспалительной реактивности системного (2-го) уровня.

К системным адаптационным изменениям при остром воспалении можно отнести стрессорную реактивность нейроэндокринной системы, лихорадку, выход нейтрофилов в циркуляцию из сосудистого и костномозгового депо, усиление лейкоцитопоза в костном

мозге, гиперпродукцию белков острой фазы в печени, развитие генерализованных форм иммунного ответа.

Накопление провоспалительных цитокинов в крови и реализация их регуляторных эффектов в настоящее время рассматриваются с позиции синдрома системного воспалительного ответа [4] – systemic inflammatory response syndrome (SIRS). При этом задействование механизмов системной реактивности возможно только при выраженном местном воспалении или его барьерной несостоятельности. Так, концентрация отдельных провоспалительных цитокинов в крови в норме обычно не превышает 5–20 пг/мл, при развитии же SIRS может возрастать в 5–10 раз, а иногда и более. Диагностика SIRS базируется на выявлении по крайней мере двух из четырёх широко используемых клинико-лабораторных его критериев: 1) температура  $>38^{\circ}\text{C}$  или  $<36^{\circ}\text{C}$ ; 2) тахикардия  $>90$  ударов/мин; 3) тахипноэ  $>20$  дыхательных движений/мин; 4) лейкоцитоз  $>12 \times 10^9/\text{л}$  или лейкопения менее  $4 \times 10^9/\text{л}$ .

Таким образом, воспалительный процесс в современном понимании формируется в результате задействования механизмов 1-го (местного), а в некоторых случаях, дополнительно, и системного (2-го) уровня. Между тем очевидно, что процесс повреждения может в некоторых случаях приобретать системный характер, и это обстоятельство, по нашему мнению, в корне меняет суть воспалительного процесса в целом. В качестве факторов системного повреждения, по-видимому, могут выступать любые нарушения гомеостаза, способные восприниматься иммунной системой как повреждающие или потенциально повреждающие [5, 6]. Так, различные шоковые состояния можно рассматривать в качестве частных проявлений воспалительного процесса особого вида, а именно, системного воспаления (СВ). В чём же заключается суть этого процесса и его принципиальные отличия от «классического» воспаления? Эти отличия, на наш взгляд, можно свести к трём основным признакам СВ:

- развивается в ответ на системную альтерацию;
- характеризуется генерализованным задействованием воспалительных механизмов не только 2-го, но и базовых провоспалительных механизмов 1-го уровня;
- провоспалительные механизмы в этом случае теряют свою протективную основу (локализация факторов альтерации) и сами становятся главной движущей силой патологического процесса.

Последнее относится не только к механизмам 1-го уровня (хотя, прежде всего, именно к ним), но и 2-го уровня, поскольку системная реакция иммунонейроэн-

докринного комплекса в этом случае будет развиваться по варианту дистресса.

Атрибутивным условием развития СВ является системная структурно-функциональная перестройка эндотелиоцитов ПКВ и опосредуемое этим расстройство микроциркуляторной гемодинамики. Основными участниками СВ являются патологически активированные во внутрисосудистой среде лейкоциты, системы комплемента и гемостаза [9, 10], а также макрофаги – резиденты микрососудов и эндотелиоциты ПКВ. В процесс индукции СВ вовлекаются также мастоциты и другие стромальные клетки периваскулярной соединительной ткани. Учитывая вышесказанное, можно сформулировать следующее определение:

**Системное воспаление – это типовой, мультисиндромный, фазоспецифичный патологический процесс, развивающийся при системном повреждении и характеризующийся тотальной воспалительной реактивностью эндотелиоцитов, плазменных и клеточных факторов крови, соединительной ткани, а на заключительных этапах – и микроциркуляторными расстройствами в жизненно важных органах и тканях.**

Системные микроциркуляторные расстройства являются ключевым составляющим СВ, и именно они определяют его сущность. Эндотелиоциты 2-го типа и сосудистые макрофаги играют решающую роль в развитии цитокинемии при СВ, в отличие от очага воспаления, где доминируют клетки-мигранты. Системная реакция ПКВ невозможна без вовлечения в этот процесс внутрисосудистых нейтрофилов, системы гемостаза и комплемента. В то же время активация этих факторов внутрисосудистой среды не всегда сразу приводит к системной реакции микрососудов, без которой говорить о наличии СВ, на наш взгляд, неправомерно.

При СВ реакция микрососудов носит тотальный характер и затрагивает, в той или иной степени, интересы всех органов. Шокогенные проявления характерны для острого варианта СВ. При хроническом СВ патологический процесс носит торпидный характер. Эти изменения сопровождаются постепенным развитием во внутренних органах склеротических изменений и снижением у них функциональных резервов, вплоть до появления в финале очевидных признаков органной недостаточности. При этом большое значение имеют математические модели, описывающие взаимодействие организма человека с различными флогогенными факторами.

## Литература

1. Молекулярные механизмы воспаления: учебное пособие / под ред. акад. РАН и РАМН В.А. Черешнева. Екатеринбург: УрО РАН, 2010. 262 с.
2. Петров Р.В., Хаитов Р.М., Черешнев В.А. Физиология иммунной системы: клеточные и молекулярно-биологические механизмы // Вестник РФФИ. 2017. № 1. С. 96–120. Специальный выпуск. к столетию Физиологического общества им. И.П. Павлова.
3. Сибиряк С.В., Черешнев В.А., Симбирцев А.С., Сибиряк Д.С., Гаврилова Т.В. Цитокиновая регуляция биотранс-
- формации ксенобиотиков и эндогенных соединений. Екатеринбург. 2006. 161 с.
4. Черешнев В.А., Зотова Н.В., Гусев Е.Ю. Идентификация критических фаз системного воспаления при сепсисе // Клиническая патофизиология. 2016. Т. 22, № 4. С. 73–78.
5. Черешнев В.А., Шмагель К.В. Иммунология: учебник. 4-е изд., перераб. и доп. – М.: НП «Центр стратегического партнерства». 2014. 520 с.

6. Черешнев В.А., Юшков Б.Г. *Патофизиология: учебник для вузов*. 2-е изд., перераб. и доп. – М.: НП «Центр стратегического партнерства». 2014. 836 с.
7. Eming S.A., Wynn T.A., Martin P. Inflammation and metabolism in tissue repair and regeneration // *Science*. 2017. Vol. 356. # 6342. P. 1026–1030.
8. Hotamisligil, G. S. Inflammation, metaflammation and immunometabolic disorders // *Nature*. 2017. Vol. 542. # 7640. P. 177–185.
9. Koupenova M., Clancy L., Corkrey H.A., Freedman J.E. Circulating Platelets as Mediators of Immunity, Inflammation, and Thrombosis // *Circulation Research*. 2018. Vol. 122. # 2. P. 337–351.
10. Merad M., Sathe P., Helft J., Miller J., Mortha A. The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting // *Annual Rev. of Immunol.* 2013. Vol. 31. P. 563–604.
11. Weinlich R., Oberst A., Beere H. M., Green D.R. Necroptosis in development, inflammation and disease // *Nature Rev. Molecular Cell Biol.* 2016. Vol. 18. # 2. P. 127–136.
12. Wojdasiewicz P., Poniatowski L., Szukiewicz D. The Role of Inflammatory and Anti-Inflammatory Cytokines in the Pathogenesis of Osteoarthritis // *Mediators of Inflammation*. 2014. ID 561459. 19 pp.

## Immunopathophysiology of inflammation

V.A. Chereshev<sup>1,2</sup>, B.G. Yushkov<sup>1</sup>, M.V. Cheresheva<sup>1</sup>, T.V. Gavrilova<sup>2</sup>,  
A.Y. Gavrilova<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Institute of Immunology and Physiology, Yekaterinburg

<sup>2</sup>E.A. Wagner Perm State Medical University, Perm

<sup>3</sup>National Research University Higher School of Economics, Moscow, Russia

In response to any kind of damage, despite its nature, the complex of local and systemic protective reactions develops in the organism. The local reactions include the inflammatory reaction in the affected tissues and the local immune response to the introduction of genetically alien antigens. In turn, the systemic protection reactions consist of the stressor reactivity of the neuroendocrine system, changes in the hematopoietic functions of the bone marrow, the development of a generalized immune response in various lymphoid organs and the production of acute phase proteins.

**Key words:** systemic inflammation, alteration, tissue damage, cytokines, mathematical modeling.

## ТЕЗИСЫ ДОКЛАДОВ УЧАСТНИКОВ І МЕЖДУНАРОДНОЙ ОЛИМПИАДЫ ПО АЛЛЕРГОЛОГИИ И ИММУНОЛОГИИ ДЛЯ СТУДЕНТОВ И МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ

### АУТОАНТИТЕЛА К МЕЖОРГАНЫМ ТЕРМОСТАБИЛЬНЫМ АНТИГЕНАМ – УЧАСТНИКИ ПАТОЛОГИЧЕСКОГО ИЛИ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА?

Т.Д. Безруков, В.С. Ким

*Астраханский государственный медицинский университет, Астрахань, Россия*

**Актуальность проблемы:** Развитие персонализированной медицины диктует поиск не только генетических, но и метаболических маркеров ранних признаков патологических изменений. К ним относят мультикомпонентную оценку уровня аутоантител при профилактическом или диагностическом обследовании (А.Б. Полетаев, Л.П. Чурилов, I.R. Cohen, M. Harel, Y. Shoenfeld). Но до настоящего времени нет единого мнения об образовании и функции аутоантител за исключением играющих ключевую роль в развитии аутоиммунных заболеваний. Еще в прошлом веке N. Jerne обосновал синтез регуляторных аутоантител, а P. Grabar предположил транспортную функцию аутоантител для продуктов катаболизма клеток. По мнению А.Д. Адо постоянные аутоиммунные процессы в здоровом организме и при заболеваниях не тождественны. Выявлено много аутоантител с физиологической функцией.

**Цель.** Осуществить поиск аутоантител в сыворотке крови к тканевым межорганным термостабильным антигенам (ТМ1 и ТМ2).

**Объекты исследования.** ТМ1 и ТМ2, были выявлены в 90 годах XX века и позднее изучены как маркеры деструктивных процессов (Д.М. Никулина, В.В. Белопасов, О.В. Петрова и др.). Поиск аутоантител осуществляли в сыворотке крови здоровых лиц, беременных женщин и пациентов с заболеваниями почек.

**Результаты.** Фракции белкового экстракта почки после воздействия 80 и 100°C были использованы в иммунизации кроликов для получения антисывороток, с помощью которых методами иммунодиффузии и иммуноэлектрофореза выявлены три линии преципитации, одна из которых идентифицирована как ферритин. Два других компонента использовали как тест-антигены, к которым обнаружили антитела в крови женщин с поздним сроком гестации и больных гломерулонефритом. Частота выявления зависела от наличия осложнения беременности и тяжести почечного заболевания.

**Выводы.** С учетом присутствия ТМ1 и ТМ2 во всех тканях организма можно полагать, что антитела к ним принимают участие в элиминации продуктов распада клеточных элементов при апоптозе, что согласуется с мнением P. Matzinger о том, что при повреждении возникают аутоиммунные реакции, обеспечивающие активацию клиренса и санацию поврежденной ткани. Считаем, что в этом случае усиливается количественная продукция нормальных аутоантител в отличие от качественных изменений при развитии аутоиммунных заболеваний.

### АССОЦИАЦИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА TLR9 С ОСЛОЖНЕНИЯМИ ПРИ АЛЛОГЕННОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ПОЧКИ

К.Ф. Джафаров, Р.Е. Бошнян, О.А. Свитич

*Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, Москва, Россия*

В последнее время достигнут большой прогресс в области аллогенной трансплантации почек. Однако в ряде случаев (до 20%) после трансплантации развиваются осложнения, связанные с воспалительными реакциями и приводящие к дисфункции или отторжению трансплантата. Известно, что запуск реакции воспаления опосредуется через рецепторы врожденного иммунитета, в частности TLRs, которые способны к распознаванию собственных молекул (DAMPs). Так, TLR9 может распознавать ДНК из разрушенных клеток при трансплантации. Изменение экспрессии гена TLR9 – возможная причина развития гипервоспаления после пересадки.

Целью данной работы являлась оценка динамики уровня экспрессии гена TLR9 в мононуклеарных клетках крови пациентов, перенесших аллотрансплантацию почки.

В работе была исследована функциональная активность мононуклеарных клеток (МНК) пациентов, поделенных на две группы: первая – 11 пациентов с трансплантацией почки, возраст от 9 до 16, вторая (контрольная) – 7 здоровых доноров (РДКБ, отделение пересадки почки; Молчанова Е.А.). Выделение МНК проводилось методом седиментации по А. Воуиш, с дальнейшим изучением динамики экспрессии гена TLR9 через 1, 14, 24, 48 часов инкубации. Далее из МНК выделяли РНК (*РИБО-сорб*, АмплиСенс, РФ) с последующей постановкой обратной транскрипции (*ОТ-1*, Синтол, РФ) и ПЦР-РВ (*ПЦР-Микс*, Синтол, РФ), амплификатор ДТ-96 (НПО ДНК-Технология, Россия). Экспрессию TLR9 оценивали относительно количества клеток. Статистическую обработку результатов проводили в Microsoft Excel.

В контрольной группе наблюдалось незначительное увеличение показателя экспрессии гена TLR9 с 14 по 48 час инкубации. Пациенты, прошедшие трансплантацию менее 10 месяцев назад, в 50% случаев показывали двукратное увеличение экспрессии гена TLR9 после часа инкубации МНК. У пациентов, прошедших пересадку более 2-х лет назад, динамика экспрессии гена рецептора снижалась в 4–10 раз в сравнении с исходными показателями. Также следует отметить, что исходные показатели экспрессии TLR9 в группе с повторной трансплантацией были выше, чем в контрольной группе.

Таким образом, высокий уровень экспрессии TLR9 у больных с повторной пересадкой может указывать на роль данного рецептора в инициации повреждения трансплантата, что делает его возможным маркером осложнений трансплантации.

### **РОЛЬ ГУМИНОВЫХ ВЕЩЕСТВ В ГИГИЕНИЧЕСКОЙ ГИПОТЕЗЕ АУТОИММУННЫХ И АЛЛЕРГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ**

**С.О. Дурнев, Ю.В. Жернов**

*Медицинский университет "Реавиз", Москва, Россия*

**Введение.** Существующая на сегодняшний день гигиеническая гипотеза аутоиммунных и аллергических заболеваний демонстрирует взаимосвязь иммунной системы человека с факторами окружающей среды. Важным в понимании гигиенической гипотезы мы считаем влияние гуминовых веществ (ГВ) на организм человека.

**Материалы и методы.** Нами были изучены и использованы следующие ГВ: гуминовые кислоты (ГК), гиматомилановые кислоты (ГМ), фульвовые кислоты (ФК) и гумусовые кислоты (ГсК). Изучение иммуотропных свойств ГВ заключалось в оценке уровня антител класса IgE на введение ГВ, и развитие анафилактической реакции у мышей на введение ГВ. Изучение всех иммуотропных свойств проводили с использованием раствора овальбумина (ОВА) и водных растворов ГВ в дозе 2,5 мг/кг и 25 мг/кг. Оценка уровня антител класса IgE на введение ГВ изучали на шести группах мышей: первая (контрольная) – мышам вводили ОВА и не вводили ГВ; вторая (2,5 мг/кг ГВ) и третья (25 мг/кг ГВ) – мышам вводили ОВА и однократно растворы ГВ за 5 дней до первой иммунизации ОВА; четвертая (2,5 мг/кг ГВ) и пятая (25 мг/кг ГВ) – мышам вводили ОВА и однократно растворы ГВ за 5 дней до второй иммунизации ОВА; шестая (отрицательный контроль) – мышам вводили раствор ФСБ. Развитие анафилактической реакции у мышей на введение ГВ изучали на четырех группах мышей: первая группа (контрольная) – мышам однократно вводили раствор ФСБ; вторая (2,5 мг/кг ГВ) и третья (25 мг/кг ГВ) группы – мышам однократно вводили растворы ГВ; четвертая группа – мышам однократно вводили раствор ОВА. Спустя 2 недели каждой группе животных была введена разрешающая ( $\times 3$ ) доза сенсibilизата.

**Результаты.** Оценка уровня антител класса IgE на введение ГВ показала следующие результаты: первая группа –  $0,45 \pm 0,04$ ; вторая и третья группы –  $0,17 \pm 0,04$  и  $0,29 \pm 0,05$ ; четвертая и пятая группы –  $0,41 \pm 0,04$  и  $0,35 \pm 0,04$ ; шестая группа –  $0,03 \pm 0,01$ . Развитие анафилактической реакции у мышей на введение ГВ оценивали по индексу Rupa и Mine: первая, вторая и третья группа – 0/4; четвертая группа – 4/4.

**Выводы.** 1. ГВ оказывают тормозящий эффект на ранних и поздних стадиях развития аллергических реакций; 2. ГВ не оказывают сенсibilизирующего эффекта. На основании всех полученных результатов и выводов можно смело утверждать, что ГВ играют важную роль в развитии и формировании аутоиммунных реакций.

### **ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ РЕЖИМЫ ПЛАЗМОЦИТОИДНЫХ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК, СФОРМИРОВАННЫЕ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ CpG-ODN РАЗЛИЧНЫХ КЛАССОВ**

**С.В. Куприянов**

*Южно-уральский государственный медицинский университет, Челябинск, Россия*

Плазмоцитотидные дендритные клетки (pDC) – популяция дендритных клеток, характеризующаяся синтезом IFN-I и способностью представлять антигены Т-клеткам. pDC являются основными производителями IFN- I, обеспечивая иммунную защиту от вирусных инфекций. Также, pDC способны функционировать как антиген презентующие клетки (АПК), при том, опосредуя как активацию вторичного иммунного ответа, так и подавление опасных иммунных реакций посредством индукции регуляторных Т-клеток (Treg). pDCs способствуют развитию гуморального иммунного ответа, регулируя функции В-лимфоцитов (опосредуя их дифференцировку в плазмциты и переключение синтеза иммуноглобулинов на IgG), но также, могут способствовать развитию Th1 и Th17 типа, связанных с клеточным иммунным ответом. Плеотропные функции pDC дают основу для активного изучения данной популяции, ее роли в патологии и возможные терапевтические манипуляции с pDC при лечении различных заболеваний. В данном исследовании рассматриваются разные типы функциональной активности плазмоцитотидных дендритных клеток, сформированные при воздействии CpG-ODN различных классов.

### **КАДАВЕРИН КАК РЕГУЛЯТОР АКТИВНОСТИ ПРО- И ЭУКАРИОТИЧЕСКИХ КЛЕТОК**

**И.А. Морозов, Т.И. Карпунина, А.П. Годовалов**

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

Кадаверин широко распространен в природе. Он может оказывать влияние на все составляющие любого биотопа организма человека. Показано, что кадаверин может быть синтезирован как клетками организма человека, так и

микроорганизмами. Можно предположить, что кадаверин является универсальным регулятором активности клеток разного происхождения.

**Цель исследования** – оценить влияние кадаверина на функциональную активность эукариотических клеток и микроорганизмов.

**Материалы и методы.** Оценивали фагоцитарную активность лейкоцитов периферической крови практически здоровых доноров по методу Shilov et al. (2003) после предварительной прединкубации клеток с кадаверином (0,01 М) в течение 60 минут при 37°C. Тест-микроорганизм *Escherichia coli* K12 культивировали в среде LB и определяли содержание кадаверина методом жидкостной хроматографии.

**Результаты.** Показано, что кадаверин обладает способностью снижать фагоцитарную активность лейкоцитов периферической крови человека, меняет соотношение фагоцитирующих клеток. В первую очередь снижается число фагоцитирующих нейтрофилов (48%). Однако среди фагоцитирующих клеток увеличивается количество тех, которые захватили более 2 объектов. Отмечено увеличение поглотительной способности эозинофилов, что требует более детального изучения. С другой стороны, установлено, что синтез кадаверина клетками *E. coli* строго зависит от содержания кислорода в окружающей среде. При культивировании в аэробных условиях содержание кадаверина в среде значительно снижалось. При уменьшении аэрации содержание кадаверина в бактериальных клетках возрастало более чем в 10 раз. Можно предположить, что в фагосомах *E. coli*, находясь в условиях недостатка кислорода и повышения содержания радикалов, увеличивает синтез кадаверина, который позволяет микроорганизму выживать в неблагоприятных условиях, поскольку тормозит фагоцитарную активность лейкоцитов и выступает в роли антиоксиданта.

**Заключение.** Таким образом, кадаверин может способствовать выживанию *E. coli* в условиях уменьшения аэрации, которые создаются в фагосоме фагоцита. В то же время, кадаверин тормозит функциональную активность фагоцитирующих клеток, давая дополнительные возможности для роста *E. coli*.

#### ДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫЕ ЭФФЕКТЫ РЕКОМБИНАНТНОГО IFN $\alpha$ 2B НА МЕМБРАННУЮ ЭКСПРЕССИЮ CD16, CD66b, CD33, CD11b НЕТРАНСФОРМИРОВАННЫХ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ *IN VITRO* НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ ЗДОРОВЫХ ДЕТЕЙ

В.Н. Павленко

Кубанский государственный медицинский университет, Краснодар, Россия

**Введение.** Нейтрофильным гранулоцитам (НГ) отводится доминантная роль, как при запуске, так и последующей регуляции и реализации иммунного ответа. Существуют популяции и субпопуляции НГ, отличающихся по рельефу мембранных антигенов, который предопределяет функциональную направленность клетки. Цель исследования – изучение влияния рекомбинантного IFN $\alpha$ 2b (rIFN $\alpha$ 2b) на нетрансформированный и экспериментально трансформированный *in vitro* фенотип CD16<sup>+</sup>CD66b<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>НГ условно здоровых детей.

**Материалы и методы.** Исследовано 80 образцов крови 10 детей 3–5 лет. Проводилось иммунофенотипирование: %НГ, несущих CD16, CD66b, CD33, CD11b рецепторы; интенсивность флуоресценции – MFI. Проведена оценка изучаемых показателей в эксперименте *in vitro* нетрансформированных НГ (контроль) и НГ после инкубации с rIFN $\alpha$ 2b и fMLP.

**Результаты.** Анализ результатов исследования выявил, что 97,03 [94,31; 98,40] % НГ контроля представлены субпопуляцией CD16<sup>+</sup>CD66b<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> с разным оснащением по MFI. Выявлен высокий MFI CD16–139 [115,3; 152,3], низкий MFI CD66b – 4,6 [4,2; 5,0], MFI CD33 – 3,7 [3,3; 4,6] и средний MFI CD11b – 18,3 [15,8; 21,0]. Под влиянием fMLP выявлена трансформация данного фенотипа: достоверное увеличение MFI CD66b (в 2,5 раза), MFI CD11b (в 1,9 раза), MFI CD16 (в 1,4 раза), что свидетельствовало об адекватном включении НГ здоровых детей в ответ на бактериальный антиген. Экспозиция с rIFN $\alpha$ 2b оказала разнонаправленное влияние на экспрессию изучаемых рецепторов: возрастание MFI CD66b (в 1,5 раза) и снижение MFI CD11b (в 1,4 раза), отсутствие эффекта по отношению к MFI CD33 и CD16. При сочетанном воздействии fMLP и rIFN $\alpha$ 2b установлено, что уровни экспрессии изучаемых рецепторов были повышены в сравнении со значениями контроля ( $p < 0,05$ ), но достоверно не отличались от показателей активированного профиля НГ под влиянием fMLP, кроме рецептора CD66b, который был выше показателей при моно-влиянии как fMLP 11,4 [10,8; 12, 8], так и rIFN $\alpha$ 2b 7,05 [5,63; 8,14] ( $p < 0,05$ ).

**Заключение.** Выявлено регуляторное влияние rIFN $\alpha$ 2b на нетрансформированный фенотип субпопуляции CD16<sup>+</sup>CD66b<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>НГ и модулирующие эффекты на трансформированный в системе *in vitro* фенотип НГ, что способствовало ремоделированию провоспалительного фенотипа НГ в противовоспалительный.

#### НЕГАТИВНО ТРАНСФОРМИРОВАННЫЙ ФЕНОТИП НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ CD64-CD32-CD16<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> – БИОМАРКЕР МАЛОЙ ГНОЙНОЙ ИНФЕКЦИИ У ДЕТЕЙ

Ю.В. Тетерин

Кубанский государственный медицинский университет, Краснодар, Россия

Доказано существование субпопуляций нейтрофильных гранулоцитов (НГ) с различной способностью регулировать или супрессировать клетки врожденного и адаптивного иммунитета, продуцирующих спектр про-, противовоспалительных и регуляторных цитокинов. Ранее показано, что при тяжелых бактериальных инфекциях у новорожденных в периферической крови (ПК) возрастает субпопуляция CD64<sup>+</sup>CD32<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>НГ. Но малоизучены фенотипические

изменения этой субпопуляции у детей с гнойным лимфаденитом и абсцессами мягких тканей – малая гнойная инфекция (МГИ).

**Цель исследования:** уточнение особенностей фенотипов субпопуляции НГ ПК, экспрессирующих CD64, CD16, CD32, CD11b, у детей здоровых и с малой гнойной инфекцией (МГИ).

**Материалы и методы.**

Методом проточной цитометрии оценивали: процент НГ, несущих CD64, CD16, CD32, CD11b, плотность их экспрессии (MFI) у детей 4–5 лет в 20 образцах ПК с МГИ на 2–3 день острого гнойного процесса и в 17 образцах ПК здоровых детей.

**Результаты.** Установлено, у здоровых детей мажорная субпопуляция НГ с фенотипом CD64<sup>+</sup>CD32<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> – 90,24% [89,9; 96,8] и 2 минорные субпопуляции с фенотипами: CD64<sup>+</sup>CD32<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> – 2,94% [2,15; 3,54] и CD64<sup>+</sup>CD32<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> – 0,52% [0; 1,3]. При МГИ мажорная субпопуляция НГ уменьшилась в 1,5 раза – 61,66% [59,7; 76,8], значительно (в 15 раз) возросла CD64<sup>+</sup>CD32<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>НГ до 33,15% [24,45; 41,85] и увеличилась CD64<sup>+</sup>CD32<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>НГ (в 3,5 раза) – 2,1% [1,57; 4,05]. При МГИ в мажорной субпопуляции MFI CD11b был выше в 3,5 раза (p<0,05), а MFI CD32, MFI CD16 не отличались от контроля. Появление CD64<sup>+</sup>CD32<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>НГ при МГИ с отсутствием экспрессии CD64 и CD32, необходимых для полноценной реализации фагоцитарной функции, является неблагоприятным фактором. Отсутствие CD32 может быть связано с врожденным дефектом, блокировкой экспрессии или шеддингом, при этом компенсаторно в 8 раз возрос MFI CD11b. Минорная субпопуляция CD64<sup>+</sup>CD32<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>НГ отличалась высоким оснащением CD16 и CD11b (в 3 раза выше контроля, p<0,05).

**Заключение.** Значительное увеличение субпопуляции НГ с негативно трансформированным фенотипом CD64<sup>+</sup>CD32<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> – прогностически неблагоприятный фактор. Отсутствие адекватного возрастания НГ с CD64 и дефект экспрессии CD32 – причина неадекватного включения НГ в реализацию процессов воспаления, что способствует возникновению МГИ у детей.

**МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ФАКТОРЫ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА В РЕГУЛЯЦИИ НЕЙРОЭНДОКРИННЫХ И ИММУННЫХ РЕАКЦИЙ ПРИ СТРЕССЕ**

И.А. Янкелевич, Г.М. Алешина, В.Н. Кокряков

Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет,  
Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

Изучалась роль молекулярных факторов врожденного иммунитета – белковых (лактоферрин) и пептидных (дефенсины) компонентов нейтрофильных гранулоцитов на течение стресс-реакции. Дефенсины крысы выделяли из экссудатных лейкоцитов крыс методами экстракции, твердофазной экстракции, высокоэффективной жидкостной хроматографии. Лактоферрин человека получали из молока путем: обезжиривания, осаждения казеина, ионообменной хроматографии и диализа. В качестве экспериментальной модели, использовали эмоционально-физический стресс – плавание в холодной воде. Опыты проводили на самцах породы Wistar. Исследуемые вещества вводили экспериментальным животным интерперитонеально, непосредственно перед аппликацией стресса, в количестве – 100 мкг/кг веса животного для дефенсинов, и 200 мкг/кг веса для лактоферрина. Превентивное введение антимикробных белков и пептидов предотвращало индуцированное стрессом повышение уровня гормона – кортикостерона (через 30 минут после аппликации стресса), по сравнению с контролем (в качестве контроля использовали группы животных, которым вводился только растворитель, а также белок овальбумин). Согласно литературным данным, кортикостатическая активность была ранее показана в условиях *in vitro* и *in vivo* для некоторых α-дефенсинов, в настоящем же исследовании продемонстрирован кортикостатический эффект для пептида RNP-3 – дефенсина, не проявлявшего таковую активность в условиях *in vitro*. Для лактоферрина данный эффект показан впервые. Участие дефенсинов в регуляции уровня кортикостерона было также подтверждено методом иммуонейтрализации – превентивным введением антител к дефенсину RNP3 перед аппликацией стресса, что привело к отмене естественного снижения уровня гормона на сроке в 3 часа. В условиях настоящего эксперимента, было также установлено нормализующее действие исследуемых молекул на стресс-индуцированные изменения в лейкоцитарной формуле крови животных. Кроме того, как дефенсины, так и лактоферрин снижали стресс-индуцированное увеличение экспрессии гена противовоспалительного цитокина IL-4, а также паттерн-распознающего рецептора TLR-4, на сроке в 3 часа после стресса. Совокупность полученных данных демонстрирует важную роль молекулярных факторов врожденного иммунитета в регуляции нейроэндокриноиммунных взаимодействий.

**РЕФЕРЕНСНЫЕ ЗНАЧЕНИЯ БЕЛКОВ СИСТЕМ STAT И SOCS У ПАЦИЕНТОВ С МЕТАБОЛИЧЕСКИМ СИНДРОМОМ**

А.А. Венедиктов, Т.А. Клименко

Медицинский институт, Орловский государственный университет им. И.С. Тургенева, Орел, Россия

Развитие метаболического синдрома сопряжено с воспалительными изменениями в тканях, при этом важную роль играют белки системы внутриклеточной трансдукции сигнала [1–2]. Многократно показана эволюционная древность данных систем и универсальность их функций как у человека, так и у животных разного уровня организации. Вариабельность количества жировой ткани коррелирует с активацией JAK/STAT систем [3]. Белки системы SOCS влияют и на формирование инсулинорезистентности (особенно значима роль SOCS-1 и SOCS-3 в ингибировании эффектов инсулина) [4–5]. Для возможности использования белков STAT и SOCS в клинической практике

как предикторов метаболического синдрома проведена оценка референсных значений концентрации в периферической крови транскрипционных факторов STAT1, STAT3, STAT6 негативных регуляторов SOCS 1, SOCS 3, SOCS 6 у пациентов с метаболическим синдромом с помощью ИФА. Всего обследовано 23 пациента (контингент разного половозрастного состава); в подборку не включены данные от лиц с известной сопутствующей патологией. По полученным данным, средние уровни оцениваемых белков составили: STAT1 – 0,46 нг/мл, STAT3 – 0,46 нг/мл, STAT6 – 0,52 нг/мл; SOCS 1 – 0,22 нг/мл, SOCS 3 – 0,76 нг/мл, SOCS 6 – 0,30 нг/мл.

#### Литература

1. Tanti J.-F., Ceppo F., Jager J., Berthou F. Implication of inflammatory signaling pathways in obesity-induced insulin resistance // *Frontiers in Endocrinology*. 2012. Vol. 3. P. 181.
2. Croker B.A., Kiu H., Nicholson S.E. SOCS Regulation of the JAK/STAT Signaling Pathway // *Seminars in Cell & Developmental Biol.* 2008. Vol. 19. # 4. P.414–422.
3. Zhang S., Morrison J.L., Gill A., et al. Maternal Dietary Restriction During the Periconceptional Period in Normal-Weight or Obese Ewes Results in Adrenocortical Hypertrophy, an Up-Regulation of the JAK/STAT and Down-Regulation of the IGF1R Signaling Pathways in the Adrenal of the Postnatal Lamb // *Endocrinology*. 2013. Vol. 154/ #12. P. 4650–4662.
4. Galic S., Sachithanandan N., Kay T.W., Steinberg G.R. Suppressor of cytokine signalling (SOCS) proteins as guardians of inflammatory responses critical for regulating insulin sensitivity. // *Biochemical J*. 2014. Vol. 461. #2. P. 177–188.
5. Emanuelli B., Macotela Y., Boucher J., Kahn C.R. SOCS-1 Deficiency Does Not Prevent Diet-Induced Insulin Resistance // *Biochemical and Biophys. Res. Commun.* 2008. Vol. 377. # 2. P. 447–452.

### СРАВНИТЕЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ИФА И ПЦР В ВЕРИФИКАЦИИ АКТИВНОСТИ 4 ТИПА ГЕРПЕСА

Л.А. Диланян

Российский университет дружбы народов, Москва, Россия

**Введение.** Актуальность изучения герпетических инфекций сохраняется на современном этапе, в связи с повсеместным распространением среди населения земного шара. Наиболее дискуссионным вопросом герпетологии является диагностика и определение маркеров активности хронических герпетических инфекций. Наиболее широко в современной лабораторной диагностике используются методы ИФА и ПЦР. Вопросом для дискуссии является субстрат, в котором должны определять инфекционный агент или специфические антитела.

**Цель исследования.** Дать сравнительную характеристику ИФА и ПЦР при верификации 4 типа герпеса.

**Материалы и методы.** Материалом для исследования служила венозная кровь, моча, а также содержимое слизистых оболочек носа, зева (на все виды исследования были получены добровольные информированные согласия родителей) от 320 детей в возрастном диапазоне от 9 месяцев до 17 лет.

**Результаты.** ИФА выявил 100% случаев контаминацию вирусом Эпштейна-Барр (ВЭБ). При этом у 67% детей определялись маркеры активации инфекционного процесса. При исследовании крови методом ПЦР были получены отрицательные результаты. Положительные реакции с 3-х биологических объектов имели 36 детей (11,25%), у 62 положительные ПЦР реакции были с зева и носа – 19,38%, у 43 детей диагностировали положительный результат только с зева (13,44%), и 71 ребенок имели положительные значения ПЦР со слизистой оболочки носа (22,19%). Положительные значения только в моче имели 51 ребенок (15,94%). Остальные дети (в количестве 57) имели отрицательный результат ПЦР-исследований с биологических сред. Дети с неопластическими процессами, длительным субфебрилитетом, лейкомоидной реакцией, лимфоаденопатией имели признаки активации хронической инфекции, резкое увеличение CD95+ клеток, положительные маркеры наличия и обострения ВЭБ в ИФА и ПЦР-исследованиях.

**Заключение.** Проведенные исследования наглядно демонстрируют преимущества ИФА крови, как скринингового исследования, в диагностики стадийности инфекционного заболевания. При этом необходимо отметить, что как единственный метод ИФА не может претендовать на диагностику в герпетологии. Только в сочетании с ПЦР диагностика инфекционных заболеваний становится доказательной.

### ДНК ВИРУСА ЭПШТЕЙНА-БАРР В БИОЛОГИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛАХ КАК МАРКЕР АКТИВНОСТИ ВИРУСНОГО ПРОЦЕССА В АТИПИЧЕСКОЙ ХРОНИЧЕСКОЙ АКТИВНОЙ ЭПШТЕЙНА-БАРР ВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ

А.С. Тер-Левонян, Е.О. Грибалева, Е.О. Халтурина

Первый московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, Москва, Россия

**Введение.** Атипичная хроническая активная инфекция, вызванная вирусами герпеса и, в частности, вирусом Эпштейна-Барр (АХА ЭБВ инфекция) является полисимптоматическим и полисиндромным, трудно диагностируемым и малоизученным заболеванием. В АХА ЭБВ инфекции степень активности вирусной инфекции часто не определяется.

**Цель.** Определить биологические материалы, которые являются наиболее подходящими для определения активности персистирующей ЭБВ инфекции.

**Материалы и методы.** Мы изучили 98 пациентов обоих полов в возрасте от 23 до 60 лет, страдающих АХА ЭБВ инфекцией. В дополнение к традиционным клиническим методам (жалобы, анамнез, физикальное обследование и т. д.) и лабораторным методам (общий анализ крови и т. д.), мы использовали ПЦР-метод для поиска генома ЭБВ в биоматериалах (кровь, слюна, моча, соскобы из миндалин и задней стенки глотки) с использованием тест-системы "Амплисенс" (Россия).

**Результаты.** Показатель обнаружения генома ЭБВ в различных типах биоматериалов от пациентов с АХА ЭБВ инфекцией различается. В слюне ДНК ЭБВ обнаружена в 76,3% случаев, в соскобе из задней стенки глотки – 63,8%, в соскобе из миндалин – 52,7%, а моча и кровь имеют самые низкие показатели обнаружения генома ЭБВ – 12,4% и 18,3%, соответственно.

**Выводы.** Самые высокие показатели обнаружения ДНК ЭБВ наблюдались в слюне и соскобах из миндалин и задней стенки глотки. Таким образом, для повышения эффективности скрининга пациента с АХА ЭБВ для определения степени вирусной активности должна использоваться ПЦР-диагностика генома ЭБВ в этих типах биологических материалов. Его определение необходимо для правильной постановки диагноза АХА ЭБВ и назначения адекватного лечения.

## **ПЕРВИЧНЫЕ ИММУНОДЕФИЦИТЫ**

**А. А. Беставашвили**

*Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова,  
Москва, Россия*

Иммунодефициты можно подразделить на первичные (врожденные), являющиеся генетически детерминированными, и вторичные (приобретенные), которые могут быть осложнениями злокачественных новообразований, инфекций, недостаточного питания или побочными эффектами иммуносупрессии, иррадиации, химиотерапии злокачественных новообразований и других заболеваний. Иммунодефициты клинически проявляются увеличением инфекций, которые могут быть приобретенными или являться реактивацией латентных инфекций. Синдромы первичных иммунодефицитов являются примерами заболеваний, созданных природой, которые предоставляют уникальную информацию о некоторых важнейших молекулах иммунной системы человека. Большинство первичных иммунодефицитов являются генетически детерминированными заболеваниями и затрагивают защитные механизмы врожденного иммунитета (фагоциты, NK клетки или система комплемента) или гуморального и/или клеточного звена приобретенного иммунитета (опосредованного В и Т лимфоцитами, соответственно). Несмотря на укоренившуюся точку зрения, что многие из первичных иммунодефицитов встречаются достаточно редко, на самом же деле некоторые формы умеренного генетического иммунодефицита встречаются достаточно часто. Большинство заболеваний обнаруживают в раннем детском возрасте, между 6 месяцами и 2 годами, визитной карточкой которых является склонность к повторным инфекциям. В данной работе я представляю примеры иммунодефицитов, начиная с дефектов во врожденном иммунитете и заканчивая дефектами в созревании и активации В и Т лимфоцитов.

## **АНАЛИЗ ГОМОЗИГОТНЫХ НОНСЕНС-МУТАЦИЙ ГЕНА ZNF341 У ЛИЦ, СТРАДАЮЩИХ АУТОСОМНО-РЕЦЕССИВНОЙ ФОРМОЙ ГИПЕР-IgE-СИНДРОМА, И ИХ РОЛИ В РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА STAT3**

**О.Б. Миронова**

*Казанский государственный медицинский университет, Казань, Россия*

**Актуальность.** Гипер-IgE-синдром (синдром Джоба) представляет собой ряд первичных иммунодефицитных состояний, сопровождаемых резким повышением уровня IgE в сыворотке крови (более 2000 МЕ/мл), характеризующиеся рецидивирующими абсцессами кожи, ассоциированными преимущественно со стафилококком, экземой и легочными инфекциями с образованием бронхоэктазов и пневматоцеле. В зависимости от типа наследования различают две формы гипер-IgE-синдрома: аутосомно-доминантную и аутосомно-рецессивную. Первая форма возникает вследствие мутаций с потерей функций в гене, кодирующем сигнальный белок – активатор транскрипции STAT3, обеспечивающий ответ клетки на сигналы от рецепторов интерлейкинов и факторов роста, а также осуществляющий контроль дифференцировки Th17, продуцирующих IL17, IL22. Вторая форма гипер-IgE-синдрома вызвана гомозиготными нонсенс-мутациями в гене, кодирующем фактор транскрипции ZNF341, контролирующей экспрессию гена STAT3 путем активации промотора. Цель. Дать оценку влияния мутаций ZNF341 на экспрессию гена STAT3 и их роли в патогенезе аутосомно-рецессивной формы гипер-IgE-синдрома. Материалы и методы. Проанализированы данные истории болезни некоторых представителей четырех семей, в которых зарегистрированы близкородственные браки. Методом секвенирования экзонов 6 и 8 гена ZNF341 идентифицированы стоп-кодоны у больных и гетерозиготных носителей, выявленных путем генеалогического анализа.

**Результаты.** По данным генеалогического анализа в семье А в 3 поколении выявлено 3 больных, в семье В – в 4 поколении 3 больных, в семье С – во 2 поколении 2 больных, в семье D – в 4 поколении 3 больных, 1 умерший и 1 самопроизвольный аборт. Детектированные гомозиготные нонсенс-мутации гена ZNF341 ингибируют экспрессию гена STAT3 вследствие невозможности связывания с промотором, что приводит к снижению концентрации мРНК STAT3 и как следствие нарушению дифференцировки Т-хелперов-17 и продукции IL-17, снижению антимикробного пептида β-дефензина-2, обуславливающему восприимчивость больных гипер-IgE-синдромом к кожно-слизистому кандидозу и другим оппортунистическим инфекциям.

**Выводы.** Гомозиготные нонсенс-мутации гена ZNF341 наблюдаются в близкородственных браках, приводят к прекращению трансляции белка и невозможности реализации им своих функций.

## КЛИНИКО-ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ТЕЧЕНИЯ СЕЛЕКТИВНОГО ИММУНОДЕФИЦИТА ИММУНОГЛОБУЛИНА А

Т.В. Савин, И.В. Кудрявцев, Р.Н. Кузнецова

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

**Введение.** Распространенность селективного дефицита иммуноглобулина А в мире, по данным Pereira L.F., et al. (1997) составляет 1:163 человека. В РФ частота данного первичного иммунодефицита, по данным РААКИ (2014), составляет 1:300 – 1:700 человек. Несмотря на то, что данная форма иммунодефицита является самой распространенной формой ПИД, стандартного лечения, позволяющего контролировать данное заболевание, в настоящий момент не предложено.

**Цель.** Разработка клинико-иммунологических критериев течения различных форм селективного иммунодефицита IgA и оценка возможности дифференцированного подхода в лечении больных.

**Материалы и методы.** Всего было обследовано 24 пациента в возрасте от 18 до 42 лет (женщины – 13, мужчины – 11), которые наблюдаются в Центре ПИД в ФБУН НИИ ЭМ им. Пастера. Контрольную группу составили 25 условно здоровых лиц. Оценка иммунного статуса включала определение у больных концентрации иммуноглобулинов, подклассов иммуноглобулина G в сыворотке крови и носоглоточных смывах, определение субпопуляций лимфоцитов и Т-хелперов. Основные результаты. Выявлены различные клинические формы течения селективного иммунодефицита иммуноглобулина А. При проведении исследования мы обнаружили, что концентрация иммуноглобулина А в носоглоточных смывах больных была снижена всего в 1,5 раза, а уровень иммуноглобулина М резко повышен в сравнении с показателями у практически здоровых лиц. Также было обнаружено повышение уровня Tfh2, Tfh1 клеток у больных селективным иммунодефицитом иммуноглобулина А. Но выявленная особенность требует дальнейшего изучения и проведения статистической обработки.

**Выводы.** Таким образом, анализ клинического течения селективного иммунодефицита иммуноглобулина А и показателей гуморального иммунитета позволяет предположить наличие связи между особенностями течения заболевания и гуморальным профилем больных.

## ХАРАКТЕРИСТИКА КЛЕТЧНОГО И ГУМОРАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА У ДЕТЕЙ С МУКОВИСЦИДОЗОМ

Д.Н. Джумаева, З.Б. Азизова

Институт иммунологии и геномики человека, Ташкент, Узбекистан

Муковисцидоз – одно из наиболее часто встречающихся наследственных заболеваний, имеющих аутосомно-рецессивный тип наследования. Целью исследования явилось изучение особенности состояния клеточного и гуморального иммунитета у детей, больных муковисцидозом. На базе медицинского центра педиатрии были обследованы 36 детей, больных муковисцидозом, в возрасте от 4 до 8 лет. Из них 26 (72,2%) детей с легочной формой, 4 (11,1%) – со смешанной формой и 6 (16,7%) – с кишечной формой. Обследование проводилось как в фазе обострения у 21 (58,3%) больного, так и в фазе ремиссии – у 15 (41,7%) пациентов. Контрольную группу составили 17 детей соответствующего возраста. Изучали количественное содержание субпопуляционного состава лимфоцитов в периферической крови иммунофлуоресцентным методом. Концентрацию IgG, IgA и IgM определяли в сыворотке крови методом ИФА. Основными жалобами больных были понижение аппетита (86,2%), головные боли (58,2%), нарушение сна (30%), быстрая утомляемость (71,6%), смена настроения (86,3%), запоры (84%). При осмотре было выявлено следующее: бледность кожных покровов (100%), задержка физического развития (36,3%), аллергические реакции (26,7%), снижение физической активности (48,4%). Анализ полученных результатов показал, что при муковисцидозе иммунологические показатели отличаются от параметров контрольной группы. Сравнительная характеристика относительного содержания Т-лимфоцитов и его субпопуляций (CD4+ и CD8+-клеток) у детей с МВ выявила достоверное их снижение ( $p < 0,05$ ), но наиболее глубокий дефицит наблюдается при обострении ( $p < 0,01$ ). Достоверно низкая экспрессия антигенов CD16 на лимфоцитах у больных детей ( $p < 0,05$ ) и сниженный уровень фагоцитарной активности может свидетельствовать о слабой резистентности организма. Сравнительная характеристика содержания циркулирующих CD20+-клеток показала, что при МВ их уровень достоверно повышен с максимальным значением во время обострения ( $p < 0,01$ ). Уровень IgG и IgA был сниженным, а IgM достоверно повышенным при обострении ( $p < 0,01$ ). Таким образом, различным клиническим состояниям муковисцидоза соответствуют определенные иммунные нарушения, определяющие тяжесть и степень прогрессирования процесса.

## ЭТИОЛОГИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА ВТОРИЧНЫХ ИММУНОДЕФИЦИТОВ

М.В. Криволапова

Российский университет дружбы народов, Москва, Россия

**Актуальность.** Вторичные иммунодефициты – заболевания, не имеющие генетических причин и являющиеся самой частой патологической формой у людей. Наибольший интерес представляют антенатальные иммунодефициты, как основа огромного разнообразия патологических состояний на последующих этапах постнатального онтогенеза.

**Цель.** Изучение этиологической структуры вторичных иммунодефицитов

**Материалы и методы.** В исследовании принимали участие 171 ребенок от матерей с различными типами гестации. Группы сравнения были представлены следующим образом: I гр. – 60 детей, от женщин с физиологическим течением беременности; II гр. – 57 детей, женщин с угрозой прерывания беременности; III гр. – 54 ребенка, от женщин с ОПГ – гестозом. Дизайн исследования включал в себя УЗИ фетоплацентарного комплекса, этиологические исследования крови матери (TORCH-комплекс), плаценты, оценку резистентности у детей первого года жизни, этиологические исследования у детей (TORCH-комплекс).

**Результаты исследований.** У детей, рожденных от женщин с физиологическим течением беременности, на первом году жизни параметры НПР и физического соответствовали возрасту, индекс резистентности был высоким. Частота вторичных иммунодефицитов составила 11,66% (n=7). В анамнезе у 4 женщин в ИФА крови определялись титры специфических антител к IV типу герпеса, у 3-х, на сроках 32 и 34 нед., диагностировалась внутриутробная гипоксия. Во II группе у детей частота СЗРП и ЗВУР составили 40,35% и 31,57% соответственно, индекс резистентности пограничный за счет аллергических заболеваний. Иммунодефицит диагностировался в 36,84% случаях (n=21), причина – тяжелая внутриутробная гипоксия и асфиксия. В III группе частота СЗРП и ЗВУР составила 24,07% и 20,37% соответственно, индекс резистентности низкий, за счет частых инфекционных заболеваний. Вторичный иммунодефицит был зафиксирован у 43 детей (79,62%). Причиной стали внутриутробные инфекции, при этом на долю инфекций семейства герпес приходилось 88,37%. Частота встречаемости IV типа герпеса составила в данной группе 84,21%.

**Выводы.** Таким образом, этиологическая структура вторичных иммунодефицитов была представлена следующим образом: на первом месте – инфекции семейства герпес, в частности IV тип герпеса; на втором месте – хроническое кислородное голодание.

## **ПОРАЖЕНИЕ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОЙ СИСТЕМЫ ПРИ ВЫСОКОАКТИВНОЙ АНТИРЕТРОВИРУСНОЙ ТЕРАПИИ ВИЧ**

**Н.А. Ступин**

*Иркутский государственный медицинский университет, Иркутск, Россия*

Анализ современного состояния проблемы позволяет признать, что за последние годы возросло количество людей, живущих с ВИЧ/СПИД (ЛЖВС), и соответственно увеличилась частота заболеваемости и смертности от сердечно-сосудистых заболеваний. К 06.2017г. 20,9 миллиона людей получали АРТ. В 2016 году ЛЖВС, составляло 36,7 миллиона человек. В 2016 году число людей, умерших от сопутствующих болезней, в т. ч. от сердечно-сосудистой патологии (ССП) составило 1 миллион. В патогенезе ССП, в т.ч. при прогрессировании атеросклероза основную роль играет ВААРТ. Атеросклеротические изменения и дислипидемия, ассоциированные с приемом ИП, что связано с наличием гомологии между каталитическим регионом протеазы ВИЧ-1, которая является точкой приложения ИП, и двух белков человека, принимающих участие в регуляции метаболизма липидов: цитоплазматического белка-1, связывающего ретиноевую кислоту (CRABP-1), и низкоплотного липопротеина-рецептора, связанного с белком (LRP), инсулинорезистентность обусловлена угнетением функции В-клеток ИП. Происходит увеличение частоты апоптоза адипоцитов и снижение дифференцировки преадипоцитов в адипоциты, результатом чего становится снижение запасов триглицеридов и увеличение расхода липидов. Нарушение захвата печеночных хиломикронов и эндотелиального клиренса триглицеридов приводит в конечном итоге к гиперлипидемии и инсулинорезистентности. Инфицирование кардиомиоцитов ВИЧ с изменением мембранных аутоантигенов, активация МФ и секреция провоспалительных цитокинов с нарушением аутоотолерантности стимулирует синтез анти- $\alpha$  миозин АТ, альтерацию и апоптоз кардиомиоцитов с развитием фиброза. ВИЧ сохраняет высокие показатели CRP, IL-1,6, TNF $\alpha$ , что поддерживает воспаление, повреждает эндотелий и изменяет обмен плазменных ЛП, снижая ЛПВП и увеличивая ЛПНП, триглицериды, что поддерживает развитие атеросклероза. Рецидивы ОКС сочетаются с высокой вирусной нагрузкой и гиперлипидемией, легочная гипертензия сопровождается высоким уровнем GRP120, при миокардитах в крови повышен титр анти- $\alpha$  миозин антител. У ЛЖВС ССЗ формируется в молодом возрасте и характеризуется ускорением прогрессирования патологии. При приеме ВААРТ формирующаяся липодистрофия, является доказанной причиной формирования ССЗ на фоне терапии, однако снижается смертность от кардиомиопатий. Ранняя диагностика и терапия снижают смертность.

## **ВЛИЯНИЕ РЕФЛЕКСОТЕРАПИИ НА СОСТОЯНИЕ ИММУННОГО СТАТУСА В РАННЕМ ВОССТАНОВИТЕЛЬНОМ ПЕРИОДЕ ИШЕМИЧЕСКОГО ИНСУЛЬТА**

**А.К. Алексеенко, А.И. Молчанов**

*Амурская государственная медицинская академия, Благовещенск, Россия*

В России инсульт ежегодно развивается более чем у 500 000 человек, занимая второе место по частоте смертельных случаев от болезней системы кровообращения. Ишемический процесс сопровождается как иммунными (гиперпродукция ИЛ 1 и 2, ФНО- $\alpha$  и др.), так и гормональными (через воздействие на переднюю долю гипофиза) изменениями, которые, в свою очередь, повышают вероятность развития инфекционно-воспалительных осложнений, ухудшающих исход инсульта. При применении медикаментозной коррекции иммунологических нарушений, помимо высокой стоимости препаратов, существует риск развития побочных эффектов, тогда как применение методов рефлексотерапии (РТ), проверенное веками, обладая иммунорегулирующим воздействием, практически не дает осложнений. Целью исследования явилось изучение иммунного статуса (ИС) пациентов в раннем восстанови-

тельном периоде (РВП) ишемического инсульта (ИИ) в зависимости от проведенного лечения в остром периоде (ОП). Иммунологическое исследование проводилось на базе первичного сосудистого отделения Городской клинической больницы Благовещенска. Представлена динамика двух группах пациентов, репрезентативных по тяжести инсульта, возрастным и гендерным показателям, в возрасте от 54 до 78 лет (средний возраст  $65,7 \pm 2,1$  года), на 2-е сутки и через 2 месяца после перенесенного ИИ. Пациенты основной группы (15 человек), кроме базисной, получали процедуры РТ с применением акупунктурных точек с иммунорегулирующим воздействием. Вторая группа (контрольная, 15 человек) – только стандартное лечение. В основной группе через 2 месяца отмечено достоверное улучшение показателей ИС: снижение общего содержания лейкоцитов ( $p < 0,05$ ), повышение уровня лимфоцитов ( $p < 0,05$ ), Т-лимфоцитов (CD3+) ( $p < 0,01$ ) и Т-хелперов (CD4+) ( $p < 0,05$ ), снижение числа В-лимфоцитов до нормальных величин ( $p < 0,01$ ) и повышение уровня IgG ( $p < 0,05$ ). В контрольной группе иммунологические нарушения сохранились, а также было зафиксировано 2 случая постинсультной пневмонии и 1 обострение хронического пиелонефрита. Таким образом, включение РТ в комплекс ранней реабилитации в ОП ИИ позволяет минимизировать иммунологические нарушения в РВП и улучшить прогноз заболевания, уменьшая восприимчивость больных к развитию инфекционных осложнений, что позволяет рекомендовать применение РТ в ОП ИИ для их профилактики.

#### ПЕРСОНИФИЦИРОВАННЫЙ ПОДХОД К ПОДБОРУ ИММУНОТРОПНЫХ ПРЕПАРАТОВ

М.С. Степанов<sup>1</sup>, Е.Е. Кобзаренко<sup>1</sup>, Daniel Eliáš<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Пермский государственный медицинский университет им. Е.А. Вагнера, Пермь Россия, <sup>2</sup>Faculty of Medicine, Charles University in Hradec Králové, Czech Republic

Иммунитет человека пластичен, способен меняться при изменениях внешней и внутренней среды. Установлены различия иммунного статуса (ИС) в зависимости от пола, возраста и антропометрических данных, а также у людей, пребывающих в разных климатических зонах, относящихся к разным этносам. В других случаях ИС меняется в связи с наличием патологии, что приводит к изменению активности иммунной системы, которое может быть скрытым и явным. Всё это требует подбора адекватной терапии. Однако не все люди будут иметь сходную реакцию на тот или иной препарат. Мало внимания уделяется тестированию препаратов *in vitro*, когда можно оценить влияние конкретного препарата на пролиферативную активность и синтетическую способность клеток. Предлагаемый подход заключается в предварительном изучении *in vitro* функциональной активности клеток иммунной системы после их инкубации с препаратами. В качестве примера приводим исследование влияния циклоферона на фагоцитарную активность лейкоцитов периферической крови (ЛПК). Периферическую кровь 9 практически здоровых доноров получали утром натощак. В 1-ю порцию вносили циклоферон в конечной концентрации 0,005 мг/мл, что соответствует максимуму препарата в крови после перорального приема (Суханов и соавт., 2012). Во 2-ю порцию крови вносили соответствующий объем физиологического раствора. Пробы инкубировали 60 минут при 37°C, после чего оценивали фагоцитарную активность ЛПК согласно (Shilov et al., 2003). Индекс стимуляции рассчитывали как отношение показателя в не стимулированной пробе к тому же показателю в пробе, стимулированной циклофероном. Индекс больше 1 свидетельствовал о стимулирующей активности препарата. Если индекс был меньше или равен 1 – препарат не оказывал эффекта вообще или снижал активность клеток. Так, среди 9 практически здоровых добровольцев циклоферон стимулировал фагоцитарную активность только у 55,5%. У 22% доноров препарат не изменил активность ЛПК, а у остальных несколько снизил. Столь индивидуальный характер реагирования иммунной системы человека предполагает необходимость и обоснованность применения персонализированного подхода к подбору иммуотропной терапии, чему может успешно служить изучение активности препаратов *in vitro* с использованием индивидуальных образцов крови или клеток иммунной системы.

#### АПТАМЕРЫ – АНАЛОГИ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ

О.А. Волошан, А.А. Бахтин

Астраханский государственный медицинский университет, Астрахань, Россия

**Актуальность.** Самое широкое распространение в медицине имеет иммунохимический анализ, основанный на реакции антиген-антитело. Увеличить специфичность и чувствительность тест-систем позволило применение моноклональных антител (МонАт), широко используемых в биологии и медицине более 30 лет в качестве диагностических молекул и лечебных таргетных препаратов. Особенно интенсивно в последние годы создаются МонАт для лечения онкологических заболеваний. Технология получения МонАт была описана G. Köhler и S. Milstein в 1975 году и до настоящего времени не претерпела принципиальных изменений. Ряд важных технологических и биологических преимуществ перед антителами имеют аптамеры – синтетические молекулы нуклеиновых кислот, созданные к определенным мишеням. Простота синтеза и модификаций позволяет создавать и применять аптамеры в исследовательских, диагностических и терапевтических целях. Они имеют равномерную активность независимо от серии синтеза, значительно меньший размер, чем антитела, поэтому легче проникают в ткани и клетки, могут иметь более высокую аффинность и специфичность.

**Цель.** На примере ДНК аптамеров ингибиторов тромбина показать или исключить межмолекулярные взаимодействия с другими мишенями – белками сыворотки крови. Объекты исследования: аптамеры ингибиторы тромбина 31RE и комплекс 31RE с протамином.

**Методы исследования:** иммуноэлектрофорез в агарозе и электрофорез в ПААГ с последующей идентификацией белков и аптамеров специфическими красителями и антителами к белкам с известной молекулярной массой.

Также были использованы молекулярные маркеры широкого диапазона. Результаты серии лабораторных экспериментов показали отсутствие комплексов аптамера 31RE с какими-либо идентифицируемыми белками сыворотки крови. Его электрофоретическая подвижность была идентичной в опыте и контроле во всех экспериментах, что может свидетельствовать о достоверности полученных результатов. Однако установлено частичное и возможно обратимое взаимодействие с альбумином комплекса ДНК аптамер-протамин в период нахождения в кровеносном русле. Этот факт можно объяснить присутствием протамин. Выводы. Полученные данные позволят ускорить продвижение ДНК-аптамеров ингибиторов тромбина в практическую медицину в качестве антикоагулянтов нового поколения.

#### **ДИНАМИЧНАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ ФЕНОТИПА CD16+CD32+CD11b+ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ ПРИ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИ ПРОТЕКАЮЩЕЙ БЕРЕМЕННОСТИ**

**В.А. Матушкина** *Кубанский государственный медицинский университет, Краснодар, Россия*

Иммунная система обеспечивает поддержание иммунной толерантности при беременности, необходимой для вынашивания полуантигенного плода, сохраняя при этом потенциал противoinфекционной защиты. Известна ключевая роль в адаптации к беременности нейтрофильных гранулоцитов (НГ): нейтрофилия, активация фагоцитоза, формирование NET, появление субпопуляций НГ, индуцирующих Treg, проявляющих ангиогенные свойства. При этом особенности трансформации фенотипа различных субпопуляций НГ при беременности мало изучены. Целью исследования явилось изучение фенотипических особенностей CD16+CD32+CD11b+НГ в течение I–III триместров физиологически протекающей беременности.

**Материалы и методы.** Исследовано 30 образцов крови беременных женщин I, II, III триместров (группы 1, 2, 3; n=10 в каждой группе) и 10 небеременных женщин (контроль), 25–27 лет. Методом проточной цитометрии проведено определение: %НГ, несущих CD16, CD32, CD11b и плотности их экспрессии (MFI).

**Результаты.** Установлено, что субпопуляция НГ с фенотипом CD16+CD32+CD11b+ у всех исследуемых групп составляла 97,2% [94,27; 98,32], но существенно отличалась по MFI. В группе 1 выявлено снижение MFI CD32 в 3,5 раза (3,69 [3,58; 3,76] против 12,3 [8,76; 15,08] в контроле,  $p<0,05$ ), MFI CD16 в 1,6 раз (20,62 [16,34; 23,83] против 32,1 [23,35; 34,75] в контроле,  $p>0,05$ ), при этом MFI CD11b увеличивался в 1,5 раза (27,35 [26,8; 27,76] против 18,0 [12,6; 25,45] в контроле,  $p<0,05$ ). Во II триместре выявлена трансформация CD16+CD32+CD11b+НГ: на фоне снижения MFI CD16 в 1,5 раза в сравнении с группой 1 и в 2 раза по отношению к контролю и уменьшения MFI CD11b до уровня контроля, отмечено повышение MFI CD32 в 2,4 раза по отношению к группе 1, не достигающее значений контроля. III триместр характеризуется значительной активацией НГ в сравнении с контролем и с группами 1 и 2, проявляющейся в увеличении уровня экспрессии всех изучаемых рецепторов: MFI CD16 до 36 [34,65; 37,43]; MFI CD32 до 16,96 [16,89; 17,33]; MFI CD11b до 34,1 [30,65; 37,4].

**Заключение.** Динамичная трансформация фенотипа субпопуляции CD16+CD32+CD11b+НГ, наблюдаемая в различные триместры физиологической беременности, с нашей точки зрения, необходима для поддержания тонкого баланса между провоспалительными и противовоспалительными свойствами НГ, что обеспечивает нормальное течение беременности.

#### **СОДЕРЖАНИЕ Т, В И НК-ЛИМФОЦИТОВ У ДЕТЕЙ РАННЕГО ВОЗРАСТА, РОЖДЕННЫХ В РЕЗУЛЬТАТЕ ЭКСТРАКОРПОРАЛЬНОГО ОПЛОДОТВОРЕНИЯ (ЭКО)**

**А.Е. Очкуренко** *Смоленский государственный медицинский университет, Смоленск, Россия*

В единичных работах показано, что у новорожденных после ЭКО имеются нарушения со стороны адаптивного и врожденного иммунитета. В тоже время крайне мало работ по изучению иммунитета детей раннего возраста после ЭКО. Целью исследования явился анализ результатов иммунофенотипирования лимфоцитов периферической крови детей раннего возраста, рожденных в результате ЭКО.

**Материалы и методы.** Нами был проведен анализ относительных и абсолютных показателей CD3, CD4, CD8, CD19, CD 16, 56-клеток периферической крови 9 детей в возрасте 2–16 мес (8,0±1,43 мес.), рожденных в результате ЭКО. Полученные результаты сравнивали с референсными значениями. Иммунофенотипирование проведено на проточном цитофлюориметре FC500. Статистическая обработка материала проводилась с использованием Microsoft Excell. В результате исследования установлено, что 88,9% детей, зачатых с помощью ЭКО, родились недоношенными; при этом от одноплодной беременности – 44,5 % детей, а от многоплодной – 55,5%. В периферической крови у всех обследованных общее количество CD3-лимфоцитов находилось в пределах нормы, а у 55,5% детей выявлен дисбаланс субпопуляций Т-лимфоцитов за счет снижения CD8-лимфоцитов. Следует отметить, что 80% детей с низкими показателями CD8-лимфоцитов рождены от многоплодной беременности. Снижение содержания CD4-клеток отмечалось только у 11,1% детей. Показатели ИРИ (CD4/CD8) отражали дисбаланс субпопуляций Т-лимфоцитов и были повышены у 22,2%, а у 11,1% понижены. Уровень В-лимфоцитов у 66,7% оставался в пределах возрастной нормы. Не было выявлено абсолютного дефицита В-клеток, более того у 33,3% детей содержание CD 19 В-лимфоцитов оказалось выше нормы. Количество НК-клеток, играющих важную роль в первой линии защиты от вирусных и опухолевых заболеваний, у 44,4% детей было ниже нормы.

**Выводы.** 1. Результаты пилотного исследования показывают, что дети первого года жизни, зачатые с помощью ЭКО, чаще рождаются недоношенными, а показатели иммунограммы не соответствуют нормативам детей, зачатых

естественным путем 2. Отмечается дефицит CD8 Т-лимфоцитов и NK-клеток; содержание CD19 В-лимфоцитов соответствует возрастной норме, либо превышает ее.

#### СПЕКТР АУТОАНТИТЕЛ У ЖЕНЩИН С НЕВЫНАШИВАНИЕМ БЕРЕМЕННОСТИ

К.Н. Чудотворов, С.В. Чепанов

*Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. И.П. Павлова;  
НИИ акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта, Санкт-Петербург, Россия*

**Введение.** В акушерско-гинекологической практике синтез аутоиммунных антител связан с рядом патологических состояний при беременности: невынашиванием, антенатальной гибелью плода, венозными тромбозами, тромбоцитопенией, гестозами (в том числе тяжелыми и прогностически неблагоприятными), развитием хронической плацентарной недостаточности. **Цель работы.** Провести анализ содержания выявленных аутоантител в периферической крови у женщин с невынашиванием беременности. **Методы и материалы:** проведено клинико-лабораторное обследование 70 беременных женщин с эпизодом одного и более невынашиваний беременности в анамнезе. В сыворотке периферической крови женщин определяли уровень аутоантител к бета-2-гликопротеину-1, кардиолипину, аннексину 5, хорионическому гонадотропину человека (ХГЧ) и протромбину методом иммуноферментного анализа с использованием коммерческих тест-систем Orgentec Diagnostika GmbH (Германия), ООО «Диа-тех-ЭМ» (Россия).

**Результаты и выводы.** При анализе полученных данных было установлено, что наиболее часто у женщин с невынашиванием беременности в анамнезе выявлялись аутоантитела к хорионическому гонадотропину – в 42,9% случаев. Аутоантитела к кардиолипину были обнаружены у 14,3% женщин, антитела к бета-2-гликопротеину-1 были выявлены в 22,9% случаев, антитела к аннексину 5 обнаружены у 20,0% женщин, антитела к протромбину обнаружены в 11,4% случаев. Сочетанное повышение антител к бета-2-гликопротеину-1 и кардиолипину наблюдалось в 11,4% случаев. Отмечалось, что антитела к хорионическому гонадотропину и аннексину 5 встречались преимущественно изолированно. Таким образом, на основании полученных результатов можно сделать вывод, что наличие аутоиммунных антител, таких как антитела к бета-2 гликопротеину-1, кардиолипину, аннексину 5, имеет большое патогенетическое значение в клинике невынашивания беременности. По нашим данным повышенное содержание антител к ХГЧ могло иметь место при прерывании беременности на ранних сроках. Неблагоприятное влияние антител к хорионическому гонадотропину человека на репродуктивные процессы, особенно на течение беременности, по-видимому, связано с непосредственным подавлением биологической активности хорионического гонадотропина человека.

#### ОСОБЕННОСТИ ИММУННОГО ОТВЕТА ПРИ ПРИМЕНЕНИИ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ ОНКОЛИТИЧЕСКИХ ВИРУСОВ У БОЛЬНЫХ РАКОМ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

П.Е. Бугаева, Г.А. Гашимов

*Первый московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, Москва, Россия*

Рак поджелудочной железы – одно из самых агрессивных злокачественных новообразований: медиана выживаемости составляет 11–19 месяцев, а пятилетняя выживаемость на III–IV стадиях не выше 8%. Течение заболевания длительное и бессимптомное, обращение к специалистам происходит при распространенном опухолевом процессе. Стандартная терапия малоэффективна, потому внимание врачей привлекают инновационные препараты, синтезированные на основе онколитических вирусов, избирательных по отношению к опухолевым клеткам. Например, реовирус (Реолизин) инфицировал клетки с мутацией K-ras, типичной для рака поджелудочной железы. При комбинированной терапии реолизином, карбоплатином и паклитакселем, у пациентов достоверно повысились уровни ИЛ-10, СЭФР-А, RANTES, что говорит о провоспалительном эффекте, а также число CD4+ и CD8+ с маркерами активации CD71, CD95 и с маркерами созревания CD45RO. На этих лимфоцитах возросла плотность CTLA4, что даёт возможность исследования эффективности комбинации реолизина, химиотерапии и ингибиторов контрольных точек. Препараты рекомбинантных вирусов – векторы для противоопухолевых генов. Аденовирус LOAd703 имеет встроенный ген белка-лиганда 4-1BBL. Рецептор 4-1BB находится на активных Т-лимфоцитах, NK-клетках, моноцитах, нейтрофилах, макрофагах. Его связывание с лигандом стимулирует пролиферацию и дифференцировку эффекторных клеток врожденного иммунитета, в основном NK-клеток. При культивировании опухолевой ткани, лимфоцитов и моноклональных антител к 4-1BB, количество лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль, было достоверно выше, чем в контрольных образцах. Модифицированный вирус герпеса I типа T-VEC несет ген гранулоцитарно-моноцитарного колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ). Его эффект основан на деструкции опухолевых клеток и на активации противоопухолевого иммунитета: активации дендритных клеток, снижении количества регуляторных и супрессорных Т-лимфоцитов и росте числа цитотоксических. На базе онкологического кластера университета им. И.М. Сеченова планируется исследование сравнительной эффективности препаратов, ранее применяемых в терапии новообразований кожи, головы и шеи, в отношении поджелудочной железы и подбор наиболее эффективной комбинации виротерапии с элементами стандартной терапии злокачественных новообразований.

**ИССЛЕДОВАНИЕ ОБЩЕЙ ТОКСИЧНОСТИ И ИММУНОГЕННОСТИ ERBB2-СПЕЦИФИЧНОГО АДРЕСНОГО ТОКСИНА DARPIN-LOPE *IN VIVO***

Д.В. Киселева, О.Н. Шилова, С.М. Деев

Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Москва, Россия

На сегодняшний день препараты на основе моноклональных антител применяются для лечения широкого спектра различных заболеваний, занимая большую часть биофармацевтического рынка. Однако их недостаточная эффективность делают актуальной задачу поиска альтернативных терапевтических агентов. Одними из таких соединений стали адресные токсины, состоящие из направляющего и эффекторного модуля.

Молекулы DARPins (Design Ankyrin Repeat Proteins) – белки с анкириновыми повторами представляют собой альтернативные каркасные белки неиммуноглобулиновой природы. На основе DARPin в лаборатории молекулярной иммунологии ИБХ РАН был создан ErbB2-специфичный адресный токсин DARPin-PE40, эффективность действия которого была показана в исследованиях *in vitro*, а также *in vivo* в иммунодефицитных мышах с привитыми опухолями.

Данная работа посвящена изучению в здоровых иммунокомпетентных мышах общих токсических и иммуногенных свойств противоракового адресного токсина DARPin-LoPE, специфичного к онкомаркеру ErbB2. Так как рекомбинантные белки, содержащие в своем составе токсины бактериального происхождения, обладают иммуногенными свойствами цитотоксический модуль в DARPin-LoPE представлен адаптированным для использования в терапевтических целях низкоиммуногенным вариантом фрагмента псевдомонадного экзотоксина А (LoPE). Специфичная мишень исследуемого белка – ErbB2 – эпидермальный фактор роста человека, гиперэкспрессируется в 20–30% случаев рака молочной железы и яичников.

Были получены и очищены рекомбинантные белки DARPin-PE40 и DARPin-LoPE в бактериальной системе экспрессии. Специфическая цитотоксическая активность исследуемых белков в отношении ErbB2-гиперэкспрессирующих клеток была подтверждена на клетках линии SK-BR-3 посредством МТТ теста, IC<sub>50</sub> для DARPin-PE40 составила 0,1 нМ, для DARPin-LoPE – 16 нМ. Исследуемые белки вводили мышам линии BALB/c в хвостовую вену через день. Анализ общей токсичности белков производился путем отслеживания изменения веса животных, измерения активности печеночных аминотрансфераз в сыворотке крови и содержания лейкоцитов в крови. Оценка общей иммуногенности осуществлялась путем анализа титра специфических антител в сыворотке крови животных с помощью иммуноферментного анализа.

Нами было обнаружено, что белок DARPin-LoPE обладает значительно меньшей общей токсичностью *in vivo* по сравнению с DARPin-PE40, что в сочетании с сопоставимой эффективностью *in vitro* делает белок DARPin-LoPE перспективным агентом для разработки препаратов противоопухолевой терапии.

**ПРОСТАГЛАНДИН E2 ПРИ ОПУХОЛЯХ И ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**

Е.В. Клопнев, Д.А. Зорин, А.А. Адилев

Астраханский государственный медицинский университет, Астрахань, Россия

**Актуальность.** Внимание многих исследователей привлекают факторы, оказывающие супрессирующее влияние на опухолевый процесс. К этим факторам относят также простагландины (ПГ), которые наряду с другими рассматривают как иммуносупрессирующие факторы с широким диапазоном влияния. Сравнительная оценка действия различных ПГ на рост опухоли показала, что ключевую роль в супрессирующем влиянии играет простагландин E2 (ПГЕ2), который продуцируется многими опухолями и поэтому нередко рассматривают как маркер прогрессии опухолевого роста (Н.М. Бережная, В.Ф. Чехун). Изучение роли ПГЕ2 при заболеваниях предстательной железы (ПЖ) было начато в Астраханском медицинском университете более 10 лет назад (Д.М. Никулина, В.М. Мирошников, П.А. Иванов, К.С. Сеидов).

**Цель.** Провести сравнительный анализ результатов лабораторного определения ПГЕ2 в образцах сыворотки крови и секрета простаты больных доброкачественной гиперплазией предстательной железы (ДГПЖ), раком предстательной железы (РПЖ), хроническим простатитом (ХП) и мужским бесплодием (МП), а также в образцах донорской крови.

**Результаты.** Установлено, что концентрация ПГЕ2 в крови при всех заболеваниях ПЖ отличается от значений в группе здоровых мужчин. Наиболее интересным оказался факт снижения концентрации ПГЕ2 в крови больных ДГПЖ и РПЖ по сравнению с донорами в среднем в 2–3 раза (соответственно 1100–1300 и 400–500 пг/мл). Уровень ПГЕ2 при опухолях простаты снижается больше, чем при воспалении. А его концентрация в секрете простаты повышается при РПЖ и ДГПЖ в десятки раз. По окончании комплексного лечения отмечено снижение уровня ПГЕ2 в секрете простаты. Результаты аналогичные данным при ХП, получены и для мужского бесплодия.

**Выводы.** Закономерности синтеза ПГЕ2 в измененной ПЖ и его секреции в биологические жидкости могут быть использованы для дифференциальной диагностики РПЖ с ХП. То, что концентрация ПГЕ2 в секрете простаты выше, чем в крови, позволяет сделать вывод о возможности использования теста на ПГЕ2 для неинвазивной диагностики заболеваний мужской половой сферы. Основным препятствием к этому является нестабильность лабораторных реагентов для иммуноферментного анализа из-за высокой биохимической активности ПГЕ2.

**ИММУНОЛОГИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ДНК-ВАКЦИНАЦИИ ПРОТИВ НЕЙРОБЛАСТОМЫ НА ОСНОВЕ ГЕНА RHOX2B В КОМБИНАЦИИ С ПОЛИЭТИЛЕНИМИНОМ И *SALMONELLA ENTERICA***

М.В. Стёганцева, В.А. Шинкевич, Е.М. Тумар, А.Н. Мелешко

*Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии, Минск, Беларусь*

**Введение.** Одной из причин неэффективности противоопухолевого иммунитета является низкая реактивность иммунных клеток по отношению к опухолевым антигенам. ДНК-вакцинация позволяет преодолеть толерантность к собственным антигенам, а за счет дополнительных компонентов простимулировать иммунный ответ. Для усиления иммуногенности могут быть использованы различные синтетические и бактериальные носители.

**Материалы и методы.** В качестве специфического для нейробластомы антигена выбран ген Phox2B. ДНК вакцина сделана на основе экспрессионного вектора и включала ген Phox2B, слитый с геном вирусного белка PVXCP. ДНК конъюгировали с линейным полиэтиленимином (ПЭИ) 20 кДа или вводили электропорацией в аттенуированный штамм бактерий *Salmonella enterica* (SE). Оценку иммуногенности вакцины проводили на мышах линии C57Bl/6 (n=21), из которых 11 самцов и 10 самок в возрасте 8–10 недель. I группа (n=3) получала в/м инъекцию пустого вектора (плацебо), II (n=3) – SE «-» интрагастрально (и/г), III – в/м вакцину, конъюгированную с ПЭИ, IV – и/г SE «RHOX2B», и V – получала комбинацию двух вакцин («ПЭИ+SE»). Через 14 дней после трехкратной вакцинации мышей умерщвляли и проводили оценку иммунного ответа.

**Результаты.** Цитотоксическая активность спленоцитов против клеточной линии мышинной нейробластомы NB41A3 во всех вакцинированных группах была достоверно выше, чем в группе плацебо (p<0,05). Достоверным увеличением продукции интерферона гамма после стимуляции белком PVXCP и RHOX2B характеризовались группы «ПЭИ+SE», и «SE-RHOX2B» и «ПЭИ+SE», соответственно (p<0,05). Также оценивали уровень анти-PVXCP антител, где статистически значимое увеличение наблюдалось только в группе «SE-RHOX2B» по отношению, как к группе плацебо, так и к группе, получавшей конъюгат с ПЭИ. Наиболее высокие показатели во всех тестах продемонстрировала группа «ПЭИ+SE».

**Заключение.** Использование аттенуированного штамма SE в качестве носителя ДНК-вакцины обеспечивает увеличение иммуногенности вакцины в большей степени, чем конъюгат ДНК с ПЭИ, а комбинация двух вариантов вакцинации оказывает бустерный эффект.

**ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ TLR ЛИГАНДОВ И CXCL12 НА МИГРАЦИЮ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК**

А.Б. Филина, О.А. Свитич, Ю.И. Амму, А.К. Голенков, Е.Ф. Клинушкина, В.В. Зверев

*Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского Москва, Россия*

**Актуальность:** за последние десятилетия были проведены многочисленные исследования, изучающие влияние хемокинов и Toll-подобных рецепторов (TLRs) на онкогенез. До конца не ясны все звенья взаимодействия вышеуказанных факторов в онкогенезе, в связи с этим целью нашей работы являлось изучить миграцию мононуклеарных клеток и опухолевых клеток по направлению к TLR лигандам и CXCL12.

**Методы и материалы:** исследуемый материал – культура клеток K562, мононуклеарные клетки (МНК) от здоровых доноров и от пациентов с миеломонобластным лейкозом до и после химиотерапии. Агенты для хемотаксиса: CXCL12 (Thermo Fisher, USA), синтетические лиганды DNA lig и RNA lig. Для исследования хемотаксиса *in vitro* использовалась камера Бойдена 96 – Well Filtration Plate Multiscreen TM-MIC с размером пор 5 мкм. Статистический анализ проводили с использованием компьютерной статистической программы BioStat 2009 5.8.3.0.

**Результаты:** CXCL12-опосредованный хемотаксис МНК здоровых доноров достоверно выше хемотаксиса интактных клеток в 2 раза. Миграция МНК здоровых доноров и доноров с миеломонобластным лейкозом по направлению к лигандам (DNA lig и RNA lig) достоверно ниже контроля 1,5 раза. Миграция опухолевых клеток (линия K562 и клетки миеломонобластного лейкоза) по направлению к CXCL12 достоверно в 6 раз ниже, чем индуцированная миграция здоровых клеток. После проведенной химиотерапии, миграция МНК от пациента с миеломонобластным лейкозом была достоверно выше миграции до химиотерапии в 2 раза.

**Выводы:** результаты исследования показали, что хемотаксис как здоровых, так и опухолевых клеток по направлению к DNA lig и RNA lig значительно ниже, чем в контроле, что может говорить о супрессорном влиянии этих лигандов на миграцию как здоровых, так и опухолевых клеток. Данный феномен можно использовать в предотвращении метастазирования опухолевых клеток и требует дальнейшего изучения. Миграция опухолевых клеток к CXCL12 значительно снижена относительно миграции МНК здоровых доноров и увеличивается по мере использования химиотерапии, из чего может следовать нарушение хоминга клеток в красный костный мозг. В дальнейшем планируется изучение активации экспрессии генов TLRs и рецепторов хемокинов в опухолевых клетках для понимания возможных взаимосвязей между этими факторами врожденного иммунитета.

### МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ СТАТУС НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ РАКОМ ГОРТАНИ

Д.А. Черемохин

Сибирский государственный медицинский университет, Томск, Россия

**Актуальность.** Рак гортани преимущественно встречается у мужчин в возрасте от 40 до 60 лет, составляющих 80–95% больных, и занимает в структуре заболеваемости мужского населения 5-е место. Внимание исследователей всего мира привлечено к изучению взаимоотношений между развивающейся опухолью и иммунной системой. Результаты исследований последних лет продемонстрировали, что нейтрофильные гранулоциты (НГ) активно вовлекаются в реализацию про- и противоопухолевых реакций.

**Цель.** Оценить структурные и функциональные особенности НГ у больных раком гортани. Материалы и методы. Обследовано 35 человек – 15 лиц основной группы (пациенты с раком гортани) и 20 условно здоровых лиц. Объект исследования – венозная кровь, в которой оценивали: общее количество лейкоцитов, лейкоцитарную формулу, степень сегментированности ядер НГ, нейтрофильно-лимфоцитарное соотношение (NLR), активность НГ в спонтанном НСТ-тесте. В сыворотке крови методом ИФА определяли цитокины, регулирующие функциональную активность нейтрофилов: ИЛ-8 и ИЛ-18.

**Результаты.** В крови онкобольных выявлено повышение относительного содержания НГ ( $p=0,022$ ) и уменьшение абсолютного количества лимфоцитов ( $p=0,015$ ) по отношению к группе сравнения. Как и во многих статьях других авторов, у пациентов мы отметили увеличение NLR ( $p=0,024$ ). Структурные особенности нейтрофилов проявлялись в увеличении количества гиперсегментированных НГ ( $p=0,001$ ), а также в увеличении среднего коэффициента сегментированности ( $p=0,024$ ). Количество НСТ-позитивных НГ у основной группы оказалось в 1,7 раз выше, чем в группе сравнения ( $p=0,01$ ). Концентрация цитокинов, стимулирующих активность нейтрофилов, в сыворотке онкобольных также превышала значения группы сравнения: ИЛ-8 – в 2,3 раза ( $p=0,007$ ); ИЛ-18 – в 1,6 раз ( $p=0,007$ ).

**Вывод.** Сегментоядерные нейтрофилы периферической крови у больных раком гортани имеют ряд структурных и функциональных особенностей, свидетельствующих об активации фагоцитарного звена иммунной системы на фоне злокачественного роста.

### ПОКАЗАТЕЛИ КЛЕТОЧНОГО ИММУНИТЕТА У БОЛЬНЫХ С ЧМТ И ПЕРСПЕКТИВЫ КЛИНИКО-ИММУНОЛОГИЧЕСКОГО ПРОГНОЗА ТЕЧЕНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЯ ПРИ РАЗЛИЧНОЙ СТЕПЕНИ ТЯЖЕСТИ

А.О. Норка, С.В. Воробьев, Р.Н. Кузнецова, С.В. Кудрявцев, С.Н. Коваленко

Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. И.П. Павлова;

Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет; Научно-

исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Институт экспериментальной медицины; Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова; Городская больница № 26, Санкт-Петербург, Россия

**Введение.** По данным Всемирной организации здравоохранения, черепно-мозговые травмы (ЧМТ) на сегодняшний день занимают третье место среди причин общей смертности населения. Однако состояние и роль иммунной системы в формировании клинических проявлений, возможных осложнений у пострадавших с ЧМТ до настоящего времени остаётся малоизученной проблемой.

**Цель.** Разработка клинико-иммунологических алгоритмов прогнозирования осложнений ЧМТ различной степени тяжести в остром периоде заболевания.

**Материалы и методы.** Выделены две группы пациентов: больные с ЧМТ различной степени тяжести ( $n=13$ ) и контрольная группа, относительно здоровые лица ( $n=40$ ). Основные методы обследования пациентов включали оценку соматического и неврологического статуса пациентов, а также оценка иммунного статуса пациентов.

**Результаты.** При обследовании пациентов было выявлено 10 случаев сотрясения головного мозга, 3 случая ушиба головного мозга легкой и средней степени тяжести. При проведении иммунологического обследования пациентов нами было выявлено достоверное повышение ( $p<0,05$ ) количества  $CD3+CD4+(Th17/Th22)$ ,  $naive\ Th\ (Th17/Th22, Th1/Th17, DP\ Th17, Tfh17/Tfh22, Tfh1/Tfh17)$ . Также отмечалось повышение количества клеток памяти. Среди них достоверно ( $p<0,05$ ) были повышены клетки  $CM\ Th\ (Th17/Th22, Th1/Th17, Tfh17/Tfh22)$  и  $EM\ Th\ (Th17/Th22)$ . Достоверное снижение клеток ( $p<0,05$ ) было выявлено среди следующих субпопуляций:  $CD3+CD4+(Th1, Th2)$ ,  $CM\ Th\ (Th1, DP\ Th17)$  и  $EM\ Th\ (Th1)$ .

**Выводы.** В результате проведенных исследований было выявлено достоверное изменение показателей клеточного иммунитета у больных с ЧМТ различной степени тяжести, что позволяет предположить взаимосвязь тяжести течения травмы и показателей иммунного статуса.

### АНТИГЕННЫЕ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МАРКЁРЫ ДИАГНОСТИКИ И ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ПРИ УРОТЕЛИАЛЬНОМ РАКЕ

Э.Д. Джуманиязова

Российский университет дружбы народов, Москва, Россия

**Введение.** Уротелиальный рак (УР) – занимает 3-е место среди онкоурологических заболеваний. Наиболее высокоиммуногенными антигенами являются раково-тестикулярные антигены (РТА). Их экспрессия и взаимосвязь с

генетическими мутациями при УР мало изучена. Цель работы – провести сравнительный анализ экспрессии РТА и молекулярно-генетических мутаций при различных клинических формах УР.

**Материалы и методы.** Изучены 24 образца опухоли, из которых 18 (75%) были представлены мышечно-инвазивной формой (МИФ) и 6 (25%) мышечно-неинвазивной формой (МНИФ) УР. Экспрессию РТА оценивали методом проточной цитометрии на аппарате FACS Canto II с использованием антител к РТА: MAGE (FL-309), GAGE3 (N10), BAGE (R-15), NY-ESO-1 (E978) (Santa Cruz Biotechnology, USA). Математическую обработку данных проводили на основе пакета статистических программ SPSS 23.0 for Windows. Статистически значимыми считали значения с доверительным интервалом не менее 95%, при  $p \leq 0,05$ .

**Результаты.** Установлено, что у больных с МИФ УР экспрессия NY-ESO-1 была в 7 (38,9%); MAGE в 15 (83,3%); GAGE в 8 (44,4%) и BAGE – в 9 (50%) случаях. Два образца опухоли экспрессировали все 4 изучаемые РТА (11,1%), 5 – три из 4-х РТА (27,8%). Экспрессию минимум одного РТА выявляли в 88,9% случаев (16 образцов). В образцах МНИФ УР экспрессию NY-ESO-1, MAGE и BAGE регистрировали в отдельных образцах (по одному антигену в каждой опухоли), что составило по 16,7% случаев для каждого РТА. GAGE был выявлен в 2 образцах (33,3%). В 2 образцах экспрессия РТА отсутствовала, а в 2 определяли экспрессию сразу 2 изучаемых РТА (33,3%). В 66,7% случаев был представлен один из 4 изучаемых РТА. Исследование молекулярно-генетических мутаций показало, что все исследуемые опухолевые культуры имели характерные для УР изменения: делецию 9 хромосомы (66,7%), отсутствие Y-хромосомы (50%) и моносомию 13 и 17 хромосом (33,3%). В единичных случаях регистрировали изменения в хромосомах 1, 3, 7 и трисомию 7 хромосомы. Было также показано увеличение генетических мутаций при нарастании степени инвазии и злокачественности УР. Сравнительное изучение молекулярно-генетических и антигенных изменений в процессе прогрессирования опухоли при УР выявило достоверную корреляцию ( $p \leq 0,05$ ) нарастания экспрессии РТА (GAGE, BAGE, MAGE и NY-ESO-1) с уровнем генетических мутаций.

## ПСИХОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ДЕТЕЙ С БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ

М.А. Калетюк

Южно-Уральский государственный медицинский университет, Челябинск, Россия

**Цель.** Выявить психологические особенности детей с бронхиальной астмой.

**Материалы и методы.** В исследование включено 40 детей с бронхиальной астмой в возрасте от 7 до 17 лет. На всех детей была заполнена специально разработанная анкета, включающей в себя: данные анамнеза жизни и заболевания, результаты лабораторно-инструментальных исследований и проведенного опроса по шкале детской депрессии (CDI) М. Ковач, сведения об имеющихся хобби, тест М.А. Шевченко «Красивый рисунок». Полученные данные были статистически проанализированы с помощью программы Microsoft Office Excel 2007.

**Результаты.** В зависимости от степени тяжести заболевания дети были разделены на три группы: I – легкая БА ( $n=15$ ), II – БА средней тяжести ( $n=7$ ) и III – с тяжелой БА ( $n=7$ ). Отдельно выделена впервые выявленная БА ( $n=11$ ). Согласно тесту М. Ковач и «Красивый рисунок», снижение настроения, достоверно чаще встречались среди детей с БА средней степени тяжести по сравнению с тяжелой и впервые выявленной БА (90% против 71% и 73%, при  $p < 0,02$ ) и не встречались при легкой БА. Межличностные проблемы, характерны для детей с БА средней и тяжелой степени тяжести по сравнению с детьми с легкой и впервые выявленной БА (90% и 85% против 40% и 45%, при  $p < 0,001$ ). Ангедония, наличие чувства одиночества также достоверно чаще преобладали у детей с БА средней и тяжелой степени тяжести по сравнению с детьми с легкой БА (71% против 33%,  $p < 0,001$ ), но были характерны и для детей с впервые выявленной БА (63%). Уровень депрессии выше среднего встречался практически у всех детей с БА средней и тяжелой степени тяжести (90 и 100%) и у каждого третьего ребенка с БА легкой и впервые выявленной БА (26 и 33%). Половина детей с БА легкой степени тяжести и впервые выявленной астмой внеурочно выбирали дыхательные упражнения (33%) образовательные (29%) занятия; каждый третий ребенок с БА средней степени тяжести занимался силовыми физическими видами спорта, а большая часть детей с БА тяжелой степени не имела хобби.

**Выводы.** Для детей с бронхиальной астмой характерны психологические особенности в зависимости от тяжести заболевания. Наиболее благоприятное влияние на психоэмоциональное состояние ребенка оказывают следующие виды внеурочной деятельности / хобби: дыхательные упражнения, образовательные, музыка.

## ВЛИЯНИЕ ПРИРОДНОГО АСТАКСАНТИНА НА СОСТОЯНИЕ МЕСТНОГО ИММУНИТЕТА ТКАНЕЙ ПОЛОСТИ РТА

М.В. Самойлова, Т.Ф. Козырева

Российский университет дружбы народов, Москва, Россия

Острые травматические поражения слизистой рта, в результате адаптации к съемным протезам, приводят к эрозивным и язвенным поражениям. Универсальной защитной и повреждающей системой организма, в том числе и при воспалении, является прооксидантно-антиоксидантная система. Природный астаксантин, в связи с особенностью биохимического строения, является самым мощным антиоксидантом, который не превращается в прооксидант. Он обладает пролонгированным противовоспалительным и иммуномодулирующим действием. Нами был предложен и разработан антиоксидантный гель на основе природного астаксантина для профилактики острой травмы протезного ложа с частичным вторичным отсутствием зубов. Проведен анализ 105 пациентов, которые были разделены на три группы. Пациентам I группы, состоявшей из 45 человек в возрасте 55–65 лет, выдавался антиоксидантный гель с астаксантином в течение 7 дней после наложения частично-съемного протеза. Пациентам II груп-

пы в количестве 35 человек в возрасте 55–65 лет профилактический гель не выдавался после сдачи ортопедической конструкции. В III группу входили 25 пациентов в возрасте 35–45 лет, не имеющих признаков воспаления слизистой рта. Группе III профилактический гель не выдавался. Во всех группах оценивалось состояние местного иммунитета полости рта при помощи иммунологического исследования определения концентрации IgG, IgM, методом радиальной иммунодиффузии по Манчини (РИД) на 4 этапах исследования: до начала исследования, спустя 7 дней после наложения частично-съёмного протеза, через 21 день после начала исследования и на 365 сутки.

Результаты исследований показали повышение местного иммунитета тканей протезного ложа, что подтверждалось увеличением содержания иммуноглобулинов класса G у I группы в 6 раз. Содержание иммуноглобулина класса M так же увеличилось через 7 суток в 2 раза после применения геля. Показатели местного иммунитета II и III группы остались без изменений. Астаксантин обладает цитокиностимулирующей активностью, выполняя роль иммуномодулятора. Анализ результатов исследований Б. Капелли и Д. Цисевски показал, что употребление небольшого количества астаксантина усиливает выработку IgM, что согласуется с нашими данными.

#### АНАЛИЗ АССОЦИАЦИИ ПОЛИМОРФНОГО МАРКЕРА A+1267G В ГЕНЕ HSP70-2 И ЕГО ЭКСПРЕССИИ У ЖЕНЩИН С ДЛИТЕЛЬНЫМ СТРЕССОМ

О.А. Понасенко, Н.А. Плотникова, Л.В. Ганковская

Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Москва, Россия

**Введение.** Психосоциальный стресс в настоящее время рассматривается как потенциальный фактор риска развития сердечно-сосудистой патологии. Одним из видов длительного стресса для женщины является жизнеугрожающее заболевание ребенка. В настоящее время проводится поиск маркеров раннего выявления осложнений длительного стресса, и среди них активно изучается белок теплового шока 70. Цель работы: исследовать особенности экспрессии гена HSP70 и распределения аллелей и генотипов полиморфного маркера A+1267G у женщин с длительным стрессом.

**Материалы и методы.** Основную группу составили 64 женщины – матери детей с онкопатологией, средний возраст – 35 (31–39) лет. Средняя длительность стресса составила 7,3 (3–8) месяца. В группу контроля вошли 60 женщин, сопоставимых по возрасту, без длительного стресса. Оценка наличия стресса проводилась по Госпитальной шкале тревоги и депрессии (HADS). Из лейкоцитов крови выделяли РНК и ДНК («АмплиПрайм РИБО-Сорб»), ИЛС, РФ) и проводили реакцию обратной транскрипции («ОТ-1», Синтол, РФ). Для определения экспрессии гена HSP70 применялся метод капельной цифровой ПЦР (Bio-Rad, США). Для детекции SNP HSP70-2 A+1267G применялся метод ПЦР с рестрикцией (фермент PstI, СибЭнзим, РФ). Результаты обработаны в программе STATISTICA 10.

**Результаты.** В основной группе выраженность тревоги по HADS составила 8,6 (6–11) баллов, в группе контроля – 5 (3–8) баллов ( $p < 0,05$ ). Уровень депрессии в основной группе составил 7,7 (6–9) баллов, в группе контроля – 3,4 (1–5) балла ( $p < 0,05$ ). У женщин с длительным стрессом выявлено достоверное увеличение экспрессии гена HSP70 по сравнению с группой контроля ( $p < 0,001$ ). Данная группа была неоднородна по профилю АД: у 10 женщин выявлены эпизоды повышения АД (группа 1а), а у 54 женщин АД было стабильным (группа 1б). Различий в экспрессии гена HSP70 между этими группами не выявлено. В то же время обнаружено, что у 80% женщин в группе 1а встречается генотип AA полиморфного маркера A+1267G в гене HSP70-2.

**Выводы.** У женщин с длительным стрессом выявлено увеличение экспрессии гена HSP70 в лейкоцитах периферической крови по сравнению с контрольной группой. Генотип AA полиморфного маркера A+1267G гена HSP70-2 может рассматриваться в качестве возможного предиктора развития артериальной гипертензии при длительном стрессе.

#### ЭПИДЕМИОЛОГИЯ АЛЛЕРГИЧЕСКОГО РИНИТА У ДЕТЕЙ ШКОЛЬНОГО ВОЗРАСТА – РЕГИОН АДЖАРИИ

М.А. Думбадзе, К.Г. Киртадзе, Н.М. Гогодзе, Н.А. Адамиа, Н.М. Партенадзе

Тбилисский государственный медицинский университет, Тбилиси, Грузия

Аллергический ринит представляет собой глобальную проблему общественного здравоохранения во всем мире. В общей структуре заболеваемости аллергией аллергический ринит довольно высок. Его распространенность среди детей варьируется в пределах 15–25% (ARIA). Симптомы АР могут потенциально ухудшить способность пациентов спать и адекватно вести себя в повседневной жизни. Особое внимание уделялось образованию детей. Цель нашей работы – оценка распространенности АР у школьников в Аджарии в различных географических регионах. Особое внимание было уделено описательным параметрам в 6 различных географических регионах.

**Материалы и методы.** На первом этапе обучения мы разработали анкету. В исследовании участвовало 738 детей. Скрининг проводился с помощью первоначального опросника, ориентированного на первую диагностику аллергического ринита. Второй этап включал клинико-аллергологическое исследование: Прик-тест *in vivo* (включая продукты питания, растения, эпидермальные и домашние аллергены).

**Результаты.** На основе самоотчета 21,8% (161 человек) исследуемой популяции считались АР. Из симптомов аллергического ринита у 57,7% изучаемого населения было чихание, 31,6% – ринорея, 49% – носовая непроходимость, 36% – носовой зуд и указанные симптомы (респонденты могли выбрать более одного ответа). Респонденты с симптомами АР (97 человек – 60%) указали сезонный характер заболевания. На втором этапе в результатах исследования *in vivo* аллергенов преобладала сенсибилизация, вызванная домашней пылью – 65,2% случаев, а в 25% слу-

чаев она была вызвана эпидермальными аллергенами кошек и собак и в 9,8% – аллергенов растений (использовались уколы).

**Заключение.** Эпидемиологическое исследование аллергического ринита у детского населения Батуми, Аджария, показало, что распространенность АР составила 21,8%. Распространенность симптомов достоверно выше в городских районах, чем в сельской местности.

## РОЛЬ АТОПИЧЕСКОЙ СЕНСИБИЛИЗАЦИИ ПРИ РЕЦИДИВИРУЮЩЕМ ЛАРИНГОТРАХЕИТЕ У ДЕТЕЙ

А.Г. Чувирова

Институт иммунологии, Москва, Россия

**Цель работы.** Анализ результатов клинко-аллергологического обследования детей с рецидивирующим ларинготрахеитом (РЛТ), изучение связи между РЛТ и атопической сенсibilизацией.

**Материалы и методы.** Обследовано 80 детей (52 мальчика и 28 девочек) с РЛТ в возрасте 3–15 лет (64 ребенка в возрасте 3–7 лет и 16 детей – 7,1–15 лет). Аллергодиагностика включала: сбор аллергологического анамнеза, постановку кожно-скарификационных проб (КСП), определение общего и специфических сывороточных IgE. Дети наблюдались у аллерголога в течение 3-х лет.

**Результаты.** Аллергические заболевания (АЗ) определены более чем у половины обследованных детей (47 чел. [58,7%]). Частота сопутствующих АЗ составила: у 20 (25%) детей сезонный аллергический ринит (САР), у 6 (7,5%) – персистирующий АР, у 21 (26,2%) – атопический дерматит (АтД), у 6 (7,5%) – сочетание САР и АтД. Уровень общего IgE колебался от 50 до 2000 МЕ/мл, отмечена полисенсibilизация (бытовые, пыльцевые, грибковые аллергены). У 33 (41,2%) детей сенсibilизация не определена. За 3 года наблюдалось формирование бронхиальной астмы у 20 (25%) детей. Практически у половины (48,5%) родственников по линии матери или отца были диагностированы АЗ.

**Выводы.** АЗ определены более чем у половины (58,7%) детей с РЛТ (САР, АтД, персистирующий АР), диагностирована полисенсibilизация (бытовые, пыльцевые, грибковые аллергены), повышение общего и специфических IgE; общий IgE колебался от 50 до 2000 МЕ/мл. У 33 [41,2%] детей сенсibilизация не определена. За 3 года наблюдения у 20 [25%] детей сформировалась бронхиальная астма. Предрасполагающим фактором является наследственная отягощенность по атопии: практически у половины родственников (48,5%) по линии матери или отца диагностированы АЗ. Детям с РЛТ, сопутствующими АЗ, семейным анамнезом, отягощенным по атопии, рекомендуется наблюдение аллерголога.

## СИНДРОМ ГИПЕРЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ НЕЙТРОФИЛОВ К ТОКСИКАНТАМ КАК ОСНОВА ПАТОГЕНЕЗА ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНИ ЛЕГКИХ

Т.Г. Юпатова, О.В. Ищенко, Д.К. Новиков

Витебский государственный медицинский университет, Витебск, Беларусь

**Цель работы.** Изучить гиперчувствительность к токсикантам (табак и продукты дизельных двигателей внутреннего сгорания) в реакции выброса миелопероксидазы (МПО) лейкоцитами у пациентов с ХОБЛ.

**Материал и методы.** В исследование включали больных с ХОБЛ средней и тяжелой степени (GOLD) (n=26). Контрольная группа состояла из здоровых добровольцев с нормальной легочной функцией (n=22). Группы были однородны по полу, возрасту, индексу курения, индексу массы тела. В качестве аллергенов использовали: водный экстракт табака сигарет (ЭТ), водный экстракт сигаретного дыма (ЭСД) и раствор выхлопных газов дизельного двигателя внутреннего сгорания (РВГ). Динамику уровня МПО определяли в супернатанте лейкосуспензии и ротовой жидкости после воздействия токсикантов (ЭТ, ЭСД, РВГ).

**Результаты.** Обнаружены статистически достоверные различия в группах после инкубации лейкосуспензии с ЭТ. В группе пациентов с ХОБЛ прирост МПО составил 99% (p<0,001). В группе контроля наблюдали повышение МПО в среднем на 60%. ЭСД не вызывал дегрануляции лейкоцитов крови и выброса МПО в контрольной группе, в то время как у пациентов с ХОБЛ отмечалось повышение МПО на 24% (p<0,001). При инкубации лейкосуспензии пациентов с РВГ прирост МПО составил около 30% у пациентов с ХОБЛ, что превысило значения контрольной группы (p=0,046). В группе пациентов с ХОБЛ после проведения орально-буккальной провокационной пробы с ЭТ положительные реакции наблюдались достоверно чаще, чем в группе контроля (p<0,05). В контрольной группе у 40% курильщиков выявлена гиперчувствительность нейтрофилов ротовой полости к ЭТ (p<0,05).

**Вывод.** При ХОБЛ выявлен синдром гиперчувствительности нейтрофилов к токсикантам путем определения выброса из лейкоцитов МПО. Лейкоциты больных ХОБЛ достоверно чаще и сильнее реагировали на токсиканты, чем лейкоциты здоровых добровольцев. Исходная генетически обусловленная гиперчувствительность нейтрофилов больных ХОБЛ к дыму и другим ингаляционным токсикантам, приводящая к их дегрануляции и выделению медиаторов и ферментов, служит движущим фактором воспаления в дыхательных путях.

**ОСОБЕННОСТИ АПОПТОЗА, ВЫРАБОТКИ МЕМБРАН-ВЫСВОБОЖДЕННЫХ МИКРОЧАСТИЦ И ЦИТОКИНОВ ПРИ ПОВРЕЖДЕНИИ ЛИМФОЦИТОВ У ЛИЦ МОЛОДОГО ВОЗРАСТА ПРИ СОЧЕТАНИИ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ И ОЖИРЕНИЯ**

Д.А. Аникин, Д.А. Мешалкина, И.А. Соловьёва, И.В. Демко, Е.А. Собко, Н.А. Малиновская

*Красноярский государственный медицинский университет им. В.Ф. Войно-Ясенецкого, Красноярск, Россия*

Бронхиальная астма (БА) одно из самых частых заболеваний дыхательных путей, в котором принимают участие многие клеточные элементы. Интерес представляет изучение особенностей БА у пациентов молодого возраста с ожирением, клеточные и цитокиновые изменения при этом. Целью исследования стало изучение особенностей апоптоза и образования мембран-высвобожденных микрочастиц (МВМ) при повреждении лимфоцитов у больных БА молодого возраста в зависимости от индекса массы тела (ИМТ). Обследовано 224 человека. Исследуемые были разделены на четыре группы: I группа – больные БА с ИМТ 18,5–24,9 кг/м<sup>2</sup>, II группа – БА с ИМТ 30–34,9 кг/м<sup>2</sup>, III группа – контрольная, с ИМТ 18,5–24,9 кг/м<sup>2</sup> и IV группа – контрольная, с ИМТ 30–34,9 кг/м<sup>2</sup>. Всем пациентам проводилось клинико-функциональное обследование, выполнялся забор венозной крови для определения адипокинов, цитокинов, выделения лимфоцитов. Количество апоптотических клеток оценивалось методом TUNEL. Микроскопия проводилась с помощью микроскопа Olympus CX41, при этом отмечались FITC-позитивные клетки, подсчитывалось число МВМ. Статистическая обработка проводилась с помощью программы Statistica 10. При изучении содержания адипокинов в крови показано, увеличение уровня лептина при одновременном снижении уровня адипонектина у больных БА молодого возраста с ожирением по сравнению с пациентами, имеющими нормальный вес. Отмечено повышение в плазме крови ФНО $\alpha$ , ИЛ-6, ИЛ-4, а также снижение содержания ИЛ-15 у больных II группы в сравнении с I группой и контролем. Выявлено, что у пациентов с БА в сочетании с ожирением процент клеток в апоптозе был значимо ниже, в сравнении с контролем с ожирением, у больных БА и нормальной массой тела отмечались подобные изменения. Также у больных II группы число МВМ значимо увеличивалось в сравнении с IV группой, тогда как у больных I группы, напротив, значимо уменьшалось в сравнении с III группой. У пациентов с сочетанием БА и ожирения была выявлена отрицательная взаимосвязь ИЛ-4 и адипонектина, а также прямая связь между числом МВМ и ОФВ<sub>1</sub>. Таким образом, можно предположить, что дисбаланс цитокинов, адипокинов и механизмов программируемой клеточной гибели является важным патогенетическим фактором как при бронхиальной астме, так и при синтропии бронхиальной астмы и ожирения.

**ЭМОЦИОНАЛЬНЫЙ ИНТЕЛЛЕКТ И АЛЛЕРГИЯ У ДЕТЕЙ**

Б.Г. Калмахелидзе, М.Х. Харбегашвили

*Педиатрическая клиника Globalmed, Тбилиси, Грузия*

Распространенность аллергических заболеваний увеличивается во всем мире. Аллергические заболевания сильно влияют на качество жизни пострадавших детей и их семьи. Многие исследования показали корреляцию между аллергическими заболеваниями и эмоциональными нарушениями у затронутых лиц. Нарушения в эмоциональном балансе, уменьшенное собственное восприятие ребенка благополучия и удовлетворенность жизнью влияют на эмоциональный интеллект. Цель нашего исследования – измерить эмоциональную интеллектуальность у детей с аллергическими заболеваниями.

**АНАЛИЗ TLR9-ИНДУЦИРОВАННОГО ЭКСПРЕССИОННОГО ПРОФИЛЯ ЦИТОКИНОВ TGF- $\beta$  И TNF- $\alpha$  В РАЗЛИЧНЫХ ФЕНОТИПИЧЕСКИХ ГРУППАХ БОЛЬНЫХ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ**

И.В. Агеева<sup>1</sup>, В.А. Капустина<sup>1</sup>, О.А. Свитич<sup>1,2</sup>

*Первый московский государственный университет им. И.М. Сеченова; <sup>2</sup>Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия*

**Введение.** Бронхиальная астма (БА) является гетерогенным заболеванием и характеризуется множеством различных клинических фенотипов, которые условно относят к группам Th<sub>2</sub> и не-Th<sub>2</sub> БА. В отличие от Th<sub>2</sub> БА, не-Th<sub>2</sub> БА остается недостаточно изученной. При данном фенотипе БА не всегда удается достичь полного контроля над заболеванием. В последние годы большое внимание уделяется механизмам врожденного иммунитета при БА, в частности рецепторам. Наиболее изученными являются Toll-подобные рецепторы (TLR), которые в последнее время разрабатываются в качестве мишеней для иммунотерапии БА. Предположительно активация TLR может влиять на баланс про- и противовоспалительных цитокинов.

**Цель.** Оценить TLR9-индуцированную экспрессию цитокинов TGF- $\beta$  и TNF- $\alpha$  в мононуклеарных клетках (МНК) больных с различными фенотипами БА.

**Материалы и методы.** В исследование были включены больные БА (n=13), находившиеся на стационарном лечении в терапевтическом отделении УКБ №1, группу контроля (n=13) составили здоровые доноры. МНК выделяли на градиенте плотности фикола-урографина и инкубировали с лигандом TLR9 (ODN2336) (Синтол, РФ). Показатели экспрессии исследовали в динамике через 1, 4, 12, 24 и 48 ч после инкубации с лигандом. Далее проводили выделение РНК (РИБО-сорб, АмплиСенс), реакцию обратной транскрипции (ОТ-1, Синтол) и ПЦР-ПВ (ПЦР-комплект, Синтол).

В результате наших исследований было выявлено, что спонтанно в группе не-Th<sub>2</sub> БА в 75% случаев выявлялась экспрессия гена TGF- $\beta$ , в то время как в группе Th<sub>2</sub> БА данный цитокин практически не определялся. TLR9-

индуцированная экспрессия гена TGF- $\beta$  была на два порядка выше в группе Th<sub>2</sub> БА, чем уровень спонтанной экспрессии. Спонтанная экспрессия гена TNF- $\alpha$  была выше в группе не-Th<sub>2</sub>-БА, при этом индукции экспрессии не отмечалось ни в одной из групп больных. В группе контроля практически не наблюдалось изменений экспрессионного профиля TGF- $\beta$  и TNF- $\alpha$  в интактных клетках. При этом под действием ODN2336 у 80% доноров определялись пиковые значения TGF- $\beta$  через час, а TNF- $\alpha$  в 70% случаев – через сутки после начала инкубации.

**Вывод.** Уровни индуцированной экспрессии генов TGF- $\beta$  и TNF- $\alpha$  различны в определённых фенотипических группах больных и группе контроля, что указывает на иммуномодулирующее действие лиганда TLR9, которое потенциально может быть использовано в персонализированной терапии БА.

## ЭПИГЕНЕТИКА РЕЦЕПТОРОВ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА И ИХ РОЛЬ В ПАТОГЕНЕЗЕ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ

Е.П. Быстрицкая<sup>1,2</sup>, Л.В. Ганковская<sup>3</sup>, Л.С. Н. амазова-Баранова<sup>4</sup>, Б.Г. Брагвадзе<sup>3</sup>, В.А. Ганковский<sup>4</sup>,  
О.А.Свитич<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова;

<sup>2</sup>Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова;

<sup>3</sup>Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова;

<sup>4</sup>Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей, Москва, Россия

**Введение.** В патогенезе бронхиальной астмы (БА) наибольшее значение имеет механизм формирования атопического фенотипа. В последние годы при изучении данного заболевания большая роль отводится рецепторам врожденного иммунитета, в частности Toll-подобным рецепторам (TLRs), распознающим широкий спектр патогенов. Установлено, что экспрессионный профиль этих рецепторов может меняться в зависимости от степени тяжести астмы. Механизм таких модификаций предположительно заключается в метилировании промоторных областей генов TLRs. Цель данной работы: определить зависимость экспрессионного профиля генов TLRs 2 и 4 от степени метилирования их промоторных областей.

**Материалы и методы.** В исследование было включено 43 пациента (от 2 до 7 лет), причем 13 из них составили группу со среднетяжелой формой астмы, 14 – с тяжелой; контрольную группу составили 16 здоровых детей. У данных пациентов были взяты соскобы эпителиальных клеток верхних дыхательных путей. Последовательно были проведены следующие реакции: выделение ДНК («РибоСорб», ИЛС, РФ), бисульфитная конверсия, метил-специфическая ПЦР («Синтол», РФ), реакция рестрикции. Методы статистической оценки (точный критерий Фишера) применялись для анализа результатов.

**Результаты.** Было обнаружено, что со снижением количества метилированных участков промоторной области гена TLR2 его экспрессия увеличивалась. Эти показатели коррелировали с тяжестью БА. У группы здоровых детей метилированные или частично метилированные области определялись менее, чем в половине процентов случаев. В то же время количество неметилированных участков увеличивалось в 2 раза в группах со среднетяжелым и тяжелым течением астмы. Та же зависимость наблюдалась и в случае TLR4, однако здесь суммарное количество неметилированных участков определялось во всех трех экспериментальных группах.

**Выводы.** Показана ассоциация между степенью метилирования и тяжестью БА. TLR2 и TLR4 могут рассматриваться как маркеры врожденного иммунитета при персонализированном подходе к ранней диагностике БА, а также в изучении её патогенеза с точки зрения эпигенетики.

## КЛИНИКО-ФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ТЕРАПИИ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ В МНОГОПРОФИЛЬНОМ СТАЦИОНАРЕ

Д.А. Иванов, О.С. Трунова, С.К. Зырянов

Российский университет дружбы народов, Москва, Россия

**Введение.** Риск развития нежелательных побочных реакций (НПР), лекарственных взаимодействий при терапии бронхиальной астмы (БА) связан с высокой длительностью лечения, зависит от фармакологической нагрузки, характера лекарственных средств (ЛС). Необходимо особое внимание для исключения риска взаимодействий при ведении коморбидных пациентов, при применении ЛС из таких групп, как системные глюкокортикостероиды (сГКС), метилксантины. Топические препараты также имеют риск НПР и нежелательных взаимодействий. Есть данные о НПР при совместном применении сГКС с нестероидными противовоспалительными средствами (НПВС), некоторыми антибиотиками, ЛС для лечения аритмий и артериальной гипертензии. Не рациональной комбинацией является одновременное назначение блокаторов и агонистов адренергических рецепторов.

**Цель.** Оптимизация клинико-фармакологических подходов к терапии пациентов с БА.

**Материалы и методы.** Исследованы истории болезни пациентов, госпитализированных с обострением БА в аллергологическое отделение многопрофильного стационара. Риск возникновения лекарственных взаимодействий определялся по базам данных ресурсов Medscape, Drugs.com, информация о взаимодействиях, НПР и фармакокинетических особенностях применения противоастматических ЛС получена из первичных источников научной литературы.

**Результаты и обсуждение.** Проанализировано 136 историй болезни пациентов. Фармакотерапия во всех случаях соответствовала Федеральным рекомендациям, были учтены актуальные рекомендации международного согласительного документа GINA. Средняя продолжительность госпитализации составила 8–9 койко-дней. Случаи

одновременного применения диуретиков и сГКС составили 5,1% (7 случаев). Блокаторы кальциевых каналов назначались на фоне применения системных глюкокортикостероидов в 9,6% (13 случаев). Одновременное назначение антимикотиков из группы азолов с сГКС зарегистрировано в 12,5% (17 случаев). Одновременное назначение сГКС и фторхинолонов отмечено в 27,9% (38 случаев). Назначение блокаторов и агонистов адренорецепторов зарегистрировано в 2,2% (3 случая). НПВС и сГКС одновременно назначались в 11,8% (16 случаев). Результаты аналитической работы предоставлены заведующему отделением, доложены на врачебной конференции в виде образовательного материала на основе собственных данных отделения.

#### **МЕСТО ТОПИЧЕСКИХ АНТИГИСТАМИННЫХ ПРЕПАРАТОВ ПРИ СЕЗОННОМ АЛЛЕРГИЧЕСКОМ РИНИТЕ**

**А.А. Нестерова, Н.М. Пахомова, В.В. Саранчина**

*Омский государственный медицинский университет, Омск, Россия*

Актуальной проблемой современной оториноларингологии является рациональная терапия сезонного аллергического ринита (САР). Сознвая, что наиболее эффективным методом лечения аллергопатологии при поливалентной сенсибилизации у пациентов с аллергическими ринитами (АР) является аллергенспецифическая иммунотерапия, при условии проведения не менее 3-х курсов, оториноларингологи вынуждены при манифестации симптомов легкой и средней тяжести курировать эту категорию больных.

**Цель работы.** Изучение сравнительной эффективности топической терапии сезонного аллергического ринита. При проведении учетов динамики купирования основных симптомов были получены результаты, позволяющие говорить о сопоставимой эффективности топической терапии САР ГКС и антигистаминными препаратами, в частности мометазона фурилатом (назонексом) и топическим комбинированным блокатором H1-гистаминовых рецепторов длительного действия лоратадином с рекомбинантным человеческим  $\alpha 2\beta$  интерфероном (Аллергофероном). При этом Аллергоферон характеризует быстрое начало действия (в течение первых 15 минут), в результате чего выраженность патологических симптомов быстро снижается. Эффективность препарата отчетливо проявляется уже к 3-им суткам приема и постепенно нарастает к 7–14 дню, что позволяет использовать его в качестве монотерапии, в то время как ТГКС из-за особенностей их действия целесообразно назначать в качестве основной составляющей комбинированной терапии с постепенной отменой других препаратов по мере стихания соответствующих симптомов САР. Быстрая положительная динамика купирования острых симптомов САР позволяет пациентам самостоятельно с 3–5-го дни переходить на двукратный прием. Присутствие рекомбинантного  $\alpha 2\beta$  интерферона, обладающего иммуномодулирующим действием, не исключает возможность применения препарата без учета микробного фона СОПН, однако этот вопрос требует дальнейшего изучения. Препарат обладает хорошим профилем безопасности, при назначении, как и любого лекарственного средства, следует учитывать индивидуальную гиперчувствительность к его компонентам. Использование лоратадина в виде геля для интраназального и глазного применения расширяет возможности эффективной и безопасной терапии САР, в том числе и с конъюнктивальными проявлениями.

#### **ВЛИЯНИЕ ТИТАНА ДИОКСИДА НА ИММУННЫЙ ОТВЕТ И РАЗВИТИЕ ПИЩЕВОЙ АЛЛЕРГИИ**

**Н.С. Аляхнович<sup>1</sup>, Д.К. Новиков<sup>1</sup>, Е.У. Унтерсмаер<sup>2</sup>**

*<sup>1</sup>Витебский государственный медицинский университет, Витебск, Беларусь;*

*<sup>2</sup>Венский медицинский университет, Вена, Австрия*

Титана диоксид ( $\text{TiO}_2$ ) – пигмент белого цвета, входящий в состав пищевых продуктов, лекарств и косметики, поступает в организм человека в виде частиц 30–300 нм в количестве 0,5–1,1 мг/кг/массы тела у взрослых и 1,4–3,2 мг/кг/массы тела у детей.

**Цель исследования.** Оценка системных и местных (на кишечник) эффектов наночастиц (НЧ)  $\text{TiO}_2$  на иммунный ответ и развитие пищевой аллергии.

**Материалы и методы.** Самки BALB/c мышей внутрижелудочно в течение 14 дней получали 10 мг/кг НЧ  $\text{TiO}_2$  чистых, либо абсорбированных 10% бычьим сывороточным альбумином ( $\text{TiO}_2$ +БСА). Контрольные группы мышей получали раствор БСА или разводящий буферный раствор. У половины мышей изучались общий IgA в кишечном лаваже и стимулированная секреция IL10, IL17a клетками селезенки, вторую группу сенсибилизировали овальбумином куриного яйца (OVA) в условиях пониженной кислотности желудка и изучали влияние  $\text{TiO}_2$  на развитие анафилаксии и уровни Ig E и A к OVA в кишечном лаваже.

**Результаты.** У мышей, получавших НЧ  $\text{TiO}_2$  и  $\text{TiO}_2$ +БСА, отмечалось увеличение общего уровня IgA в кишечном лаваже в сравнении с контролем, но разница не достигла статистических различий. Клетки селезенки мышей, получавших как чистый  $\text{TiO}_2$ , так и  $\text{TiO}_2$ +БСА, после 72 часов инкубации с растворами  $\text{TiO}_2$  и  $\text{TiO}_2$ +БСА секретиовали большее количество IL10, чем клетки мышей контрольной группы ( $p<0,01$ ,  $p<0,05$ ). Клетки селезенки мышей, получавших  $\text{TiO}_2$ , после 72 часов инкубации с раствором  $\text{TiO}_2$  секретиовали большее количество IL17a, чем клетки контрольной группы мышей ( $p<0,01$ ). Таких изменений в группах мышей, получавших только БСА, не наблюдалось. У сенсибилизированных OVA мышей, его внутривенное введение вызывало анафилаксию со значительным падением температуры тела животных и подъемом MCP1 в сыворотке мышей, получавших НЧ  $\text{TiO}_2$  или БСА, в сравнении с контрольной группой ( $p<0,05$ ). Таких изменений не происходило в группе животных, получавших НЧ  $\text{TiO}_2$ +БСА. В кишечном лаваже уровни антител класса E и A к OVA также обнаружены у мышей, получавших до сенсибилизации НЧ  $\text{TiO}_2$  или БСА, в сравнении с животными, получавшими НЧ  $\text{TiO}_2$ +БСА. Заключение.

Связывание НЧ  $\text{TiO}_2$  с белковым носителем изменяет иммунологическую реактивность комплекса, влияя на развитие аллергии. Эти данные важны для оценки безопасности перорального поступления  $\text{TiO}_2$  в организм человека.

#### АНАЛИЗ ФАКТОРОВ РИСКА НЕПРЕРЫВНО-РЕЦИДИВИРУЮЩЕГО ТЕЧЕНИЯ АТОПИЧЕСКОГО ДЕРМАТИТА У ДЕТЕЙ

А.А. Обухова, Л.Р. Пахнова

Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет, Санкт-Петербург, Россия

**Актуальность.** Рост распространенности аллергических болезней, учащение тяжелых клинических форм аллергической патологии выдвигают проблему аллергии на одно из первых мест в современной клинической медицине. Среди аллергических заболеваний кожи у детей по распространенности преобладает атопический дерматит (АД). Несмотря на широкое внедрение терапии местными противовоспалительными средствами, устойчиво сохраняется высокий процент пациентов с непрерывно-рецидивирующим течением заболевания (НРТЗ). Цель: выявление значимых факторов риска формирования тяжелых форм АД у детей с НРТЗ.

**Результаты.** Была проведена сравнительная оценка особенностей клинического течения АД у детей в возрасте от 4 месяцев до 3 лет, находившихся на лечении в отделении аллергологии Областной детской клинической больницы им. Силичевой с 2014 по 2017 гг., с проведением статистического анализа и выявлением корреляции ( $r$ ) между факторами риска и формированием НРТЗ. Основную группу составили 36 пациентов раннего возраста с тяжелой формой АД, группу сравнения – 43 ребенка с легкой степенью тяжести заболевания. По результатам исследования было выявлено, что в течение 2014–2017 гг. возросла частота госпитализации детей раннего возраста, больных АД с НРТЗ (28%). ИФА и ПЦР-диагностики у 45 из 79 обследованных больных раннего возраста подтвердили наличие бактериальной или микст-инфекции (56,9%). Отягощенный аллергоанамнез имел значение со стороны матери более выраженную связь, чем у отца ( $r=0,48$ ,  $p<0,001$  и  $r=0,34$ ,  $p<0,05$ ). Дополнительные факторы НРТЗ АД: наличие гестоза I и II половины беременности ( $r=0,32$ ,  $p<0,01$ ), постоянная угроза прерывания ( $r=0,49$ ,  $p<0,001$ ), на первом году у детей (повторные ОРВИ, бронхиты ( $r=0,49$ ,  $p<0,01$ ), признаки дисбактериоза кишечника ( $r=0,52$ ,  $p<0,001$ )).

**Выводы.** Проведенный нами анализ показал устойчивый рост частоты госпитализаций детей по поводу НРТЗ АД, с ранней клинической манифестацией. Отсутствие положительной клинической динамики на фоне базисной терапии в связи с наличием вторичного инфицирования бактериальной или микст-флорой. Формирование осложненных форм АД обусловлено комплексом факторов риска (семейная отягощенность по аллергическим и неаллергическим заболеваниям, осложненное течение беременности, повторные инфекционные заболевания и дисбактериоз кишечника на первом году жизни).

#### ПРОГНОСТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ УРОВНЯ ФРАКТАЛКИНА У ДЕТЕЙ С АТОПИЧЕСКИМ ДЕРМАТИТОМ

Л.Р. Пахнова

Астраханский государственный медицинский университет, Астрахань, Россия

**Введение.** Фракталкин (CX3CL1), относящийся к семейству хемокинов, играет важную роль в «привлечении» базофилов, эозинофилов, лейкоцитов и тучных клеток к патологическому очагу, в результате чего активируется адгезия клеток к сосудистому эндотелию с последующей миграцией в ткани и высвобождением медиаторов, и инициируется воспалительная реакция различного генеза.

**Цель:** установить прогностическое значение уровня CX3CL1 в сыворотке крови у детей с атопическим дерматитом (АД) в зависимости от степени тяжести и сопутствующей патологии желудочно-кишечного тракта (ЖКТ).

**Материалы и методы.** Исследован уровень CX3CL1 у 100 детей с АД с детской формой заболевания и коморбидной патологией ЖКТ (в т. ч. лямблиоз, реактивный панкреатит), дошкольного возраста, при наличии информированного добровольного согласия родителей. В группе сравнения было 50 детей с АД, без патологии ЖКТ, в группе контроля – 20 соматически здоровых детей. Статистическую обработку результатов проводили при помощи статистической программы Statistica 12.0 («StatSoft, Inc.», США). Уровень CX3CL1 оценивали с помощью иммуноферментного анализа крови с применением наборов для количественного определения CX3CL1 в биологических жидкостях «RayBio® Human Fractalkine» («RayBiotech, Inc.», США).

**Результаты.** В результате проведенного исследования было выявлено значимое повышение уровня CX3CL1 в группе детей АД+реактивный панкреатит+лямблиоз по сравнению с группой детей АД без патологии ЖКТ и группой контроля – медиана [25; 75 перцентиль] 170,95 [137,8–203,3] vs 102,7 [83,2–155,85] vs 25,7 [22,6–36,8] пг/мл;  $p=0,0005$ .

**Выводы.** Выявлена повышенная продукция CX3CL1, уровень которого определяет степень тяжести АД по принципу прямой корреляционной зависимости. Установлено, что сочетание АД и патологии ЖКТ сопровождается выраженными изменениями уровня CX3CL1 по сравнению с показателями при атопической монопатологии, что свидетельствует об активации системной воспалительной реакции, что может иметь существенное значение в иммунопатогенезе атопического заболевания.

## ОПЫТ ПРИМЕНЕНИЯ ПРЕПАРАТА ОМАЛИЗУМАБ В ТЕРАПИИ ХРОНИЧЕСКОЙ КРАПИВНИЦЫ. ОПИСАНИЕ КЛИНИЧЕСКОГО СЛУЧАЯ И ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

П.М. Пантелеймонова, Н.М. Рахматуллина

Казанская государственная медицинская академия, филиал Российской медицинской академии последипломного образования, Казань, Россия

**Цель исследования:** обзор литературы, посвященной лечению хронической крапивницы препаратом Омализумаб за последние 5 лет, рассмотрение клинического случая.

**Материалы и методы.** Используются публикации электронного каталога республиканского медицинского библиотечно-информационного центра, поиск осуществлялся по словам: хроническая крапивница, омализумаб.

**Результаты исследования.** Установлено, что крапивница диагностируется у 15–25% людей в популяции, при этом четверть случаев приходится на хроническую крапивницу (ХК). До 60% больных ХК страдают аутоиммунной её формой. Аутореактивность у пациентов с ХК в настоящее время разделяют на два подтипа: появление IgG-аутоантител к FcεRI-рецепторам и появление IgE к аутоантителам. Омализумаб, представляя собой рекомбинантные гуманизированные моноклональные анти-IgE-антитела, связывает свободные IgE и, образуя биологически инертную молекулу, уменьшает вероятность их взаимодействия с тучными клетками. Пациент К., 64 года обратился в ГЦА г. Казани с жалобами на множественные красные волдырные высыпания по всему телу. Больным себя считает с 2010 года, когда впервые заметил подобные элементы на бедрах. В течение 7 лет неоднократно госпитализировался с диагнозами острая крапивница, хроническая рецидивирующая крапивница. В течение нескольких месяцев К. получал терапию современными H1-блокаторами по 1 т/сутки, далее с увеличением дозы до четырёхкратного приёма согласно схеме терапии второй линии, в течение 4 недель без значительного терапевтического эффекта. Так, при последней госпитализации по шкале активности высыпаний и зуда UAS7 пациент отмечал 6 баллов за сутки (из 6 максимальных) и 36 баллов за неделю (из 42 максимальных). Уровень IgE общего на тот момент составлял 16,56 МЕ/мл.

В ноябре пациенту подкожно было введено 300 мг омализумаба. В течение первых суток количество высыпаний сократилось, через 48 часов элементы исчезли полностью. Нежелательных эффектов пациент не отмечал. Уровень IgE общего при выписке – 92,18 МЕ/мл. Проба с аутосорваткой положительна.

**Вывод.** Препарат Омализумаб является действенной патогенетической терапией хронической крапивницы; в ходе терапии реактивность кожи не меняется; Омализумаб может являться препаратом выбора при хронической крапивнице с нормальным уровнем IgE общего.

## РАЗРАБОТКА КРИТЕРИЕВ ВКЛЮЧЕНИЯ ВИТАМИНА D В КОМПЛЕКСНУЮ ТЕРАПИЮ БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКОЙ СПОНТАННОЙ КРАПИВНИЦЕЙ НА ОСНОВАНИИ ИЗУЧЕНИЯ МЕТАБОЛИЗМА ВИТАМИНА D

А.В. Витчук

Смоленский государственный медицинский университет, Смоленск, Россия

**Актуальность.** Более половины всех больных хронической спонтанной крапивницей (ХСК) резистентны к базисной терапии антигистаминными препаратами, что вызывает необходимость поиска альтернативных методов лечения.

**Цель исследования:** впервые провести комплексную оценку содержания основных метаболитов витамина D и их рецепторов у больных ХСК и установить показания для применения витамина D в терапии ХСК.

**Материалы и методы.** В исследование включено 126 больных ХСК и 61 здоровый донор, которым определяли сывороточную концентрацию 3-х метаболитов витамина D – D<sub>2</sub>, 25(OH)D, 1,25(OH)<sub>2</sub>D, рецепторы к витамину D (VDR) мононуклеарных клеток крови. На протяжении 4 недель 50 больных дополнительно к базисной терапии получали холекальциферол 10000 ед/сут. Активность ХСК оценивали по шкале UAS-7 в баллах. Для расчета уровня значимости (p) использовали критерии Манна–Уитни и Вилкоксона.

**Результаты.** Гиповитаминоз D (25(OH)D < 30 нг/мл) выявлен у 54,2% больных. При наличии гиповитаминоза D активность ХСК выше, чем при нормальном уровне витамина D (UAS-7 – 24,3±3,95 и 17,5±2,87, p < 0,05). Отрицательная корреляция между UAS-7 и 25(OH)D имеется у больных с гиповитаминозом D и отсутствует при нормальном уровне витамина D. Концентрация метаболитов витамина D (D<sub>2</sub>, 1,25(OH)<sub>2</sub>D) и VDR у больных соответствовали данным в контроле. Терапия холекальциферолом больных с гиповитаминозом D привела к снижению UAS-7 с 24,3±3,95 до 15,8±3,01 (p < 0,05), при нормальном уровне витамина D UAS-7 достоверно не изменился. Прием холекальциферола снизил UAS-7 у больных с тяжелой степенью активности ХСК с 37,2±1,06 до 22,4±2,65 (p < 0,05) и средне-тяжелой активностью с 20,7±0,58 до 14,4±1,29 (p < 0,05). У пациентов с легкой активностью заболевания UAS-7 не изменился.

**Выводы:** 1. У 54,2% пациентов с ХСК установлено снижение 25(OH)D, тогда как уровни других метаболитов (D<sub>2</sub>, 1,25(OH)<sub>2</sub>D) и VDR соответствовали данным в контроле. 2. У больных с гиповитаминозом D активность крапивницы выше, чем у пациентов с нормальным уровнем витамина D, и имеется отрицательная корреляция между 25(OH)D и UAS-7. 3. Критерием включения витамина D пациентам с тяжелой и средне-тяжелой активностью ХСК является низкий уровень 25(OH)D.

### ОСОБЕННОСТИ КЛИНИЧЕСКОЙ КАРТИНЫ ИНФЕКЦИИ, ОБУСЛОВЛЕННОЙ ВИРУСОМ ГЕРПЕСА 6 ТИПА, У ДЕТЕЙ ПРИ РАЗЛИЧНОЙ ВИРУСНОЙ НАГРУЗКЕ

А.И. Кусельман, Ю.А. Антохина, И.Л. Соловьева, Е.Н. Галич

Ульяновский государственный университет, Ульяновск, Россия

**Введение.** Вирус герпеса 6 типа является распространенной герпетической инфекцией, сопровождающейся лихорадкой, лимфаденопатией, артралгиями, эфемерной сыпью и порой осложняющейся пневмоническим процессом.

**Цель исследования:** определение взаимосвязи клинико-лабораторной картины инфекционного процесса от величины вирусной нагрузки ВГ-6. Материалы и методы исследования: проведен ретроспективный анализ данных 100 детей, у которых методом ПЦР количественно была определена вирусная нагрузка ВГ-6.

**Результаты.** Наиболее частыми синдромами, встречающимися при ВГ-6-инфекции, стали лихорадка (65%), на фоне которой возникал катаральный синдром, реже – фебрильные судороги; региональная лимфаденопатия (38%), сыпь (29%) – везикулярная в ротовой полости и генерализованная пятнисто-папулезная; суставной синдром (18%). Наиболее часто встречалось поражение респираторного тракта и ЛОР-органов в виде острого тонзиллита (13%), ринофарингита (13%), пневмонии (9%) и бронхита (11%). Нами впервые были изучены особенности клиники инфекционного процесса в зависимости от вирусной нагрузки ВГ-6 (минимальная – 100, максимальная – 73600 копий/мл) и сделаны выводы о наличии связи между вирусной нагрузкой и некоторыми клинико-лабораторными показателями. Отсутствовала корреляционная связь между некоторыми параметрами (лихорадка, суставной синдром, экзантема, лейкоцитоз) и вирусной нагрузкой, за исключением частоты встречаемости ослабленного дыхания и содержания нейтрофилов. В 57% случаев ВГ-6 был выделен вместе с другими вирусами: ВПГ 1–2 типа, ЦМВ, ВЭБ, энтеровирусами. Анализ тяжести клинической картины у детей с моно-инфекцией ВГ-6 и с вирус-вирусной ассоциацией не показал достоверных различий.

**Выводы.** 1. Клиническая картина ВГ-6 типа ассоциируется с поражением различных органов и систем. 2. У 57% детей вирус был в составе вирус-вирусных ассоциаций, наличие которых не отягощало клиническое течение ВГ-6-инфекции. 3. Имеется прямая корреляционная связь между величиной вирусной нагрузки ВГ-6 и степенью поражения дыхательной системы, выраженностью нейтрофилии.

### РОЛЬ СТАФИЛОКОККОВОЙ ИНФЕКЦИИ В ТЕЧЕНИИ АТОПИЧЕСКОГО ДЕРМАТИТА У ДЕТЕЙ

С.И. Пономарева, Я.А. Ахременко

Медицинский институт, Северо-Восточный федеральный университет им. М.К. Аммосова, Якутск, Россия

Наиболее часто высеваемым, интенсивно изучаемым и хорошо известным в качестве триггера атопического дерматита (АД) микроорганизмом является *Staphylococcus aureus*. Целью настоящего исследования было изучение роли стафилококковой инфекции в течении АД у детей Якутска. Было обследовано 70 детей, страдающих АД, в возрасте от 2 до 15 лет. Контрольную группу составили 42 здоровых ребенка 5–7 летнего возраста. Методом бактериальных отпечатков по Н.Н. Клемпарской на коже здоровых детей был установлен следующий состав микрофлоры: у 70% детей обнаруживались сарцины, у 67,5% – *S. saprophyticus*, у 37,5% – *E. coli* в количестве от 1 до 3 lg КОЕ. У 20% детей обнаруживались *S. epidermidis* в количестве от 1 до 6 lg КОЕ, у 1 ребенка (2,5%) – нейссерии в количестве 3 lg КОЕ, у 3 (7,5%) единичные клетки плесени и в 5% случаев бактериальный рост не наблюдался. При этом практически не встречалось монокультур. У детей с АД микрофлора свободной от высыпаний кожи представлена четырьмя видами микроорганизмов (*S. aureus* – 27%, *S. haemolyticus* – 27%, *S. epidermidis* – 12%, *Enterococcus faecalis* – 7%). На пораженных участках выделено 5 видов (*S. aureus* – 67%, *S. haemolyticus* – 57%, *S. epidermidis* – 12%, *Streptococcus pyogenes* – 2%, *Enterococcus faecalis* – 7%), как видно, на пораженных участках отмечается увеличение вегетации стафилококков, особенно гемолитических ( $p < 0,05$ ), а патогенные стафилококки (*Staphylococcus aureus*) выявлялись только у больных АД. Следует отметить, что преимущественно встречались монокультуры указанных микроорганизмов, которые высевались в довольно высоких титрах – от 3 до 7 и более lg КОЕ, а также довольно часто (35%) встречалась ассоциация стафилококков (*S. aureus* et *S. epidermidis* либо *S. aureus* et *S. haemolyticus*). Установлена, прямая зависимость тяжести течения АД от частоты встречаемости золотистого ( $r = 0,99$ ) и гемолитического стафилококка ( $r = 0,98$ ) на коже больных АД свободной от высыпаний, а на пораженной коже – прямая зависимость тяжести течения АД от частоты встречаемости гемолитического стафилококка ( $r = 0,9$ ). Изучение микробного пейзажа кожных покровов у больных с АД расширяет представление о патогенетической роли инфекционных агентов в течении заболевания, а также позволяет рационализировать антимикробную терапию при данной патологии.

### КЛИНИЧЕСКИЕ И ДОПЛЕРОГРАФИЧЕСКИЕ КРИТЕРИИ ЭФФЕКТИВНОСТИ СУБЛИНГВАЛЬНОЙ АЛЛЕРГЕН-СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ИММУНОТЕРАПИИ СТАНДАРТИЗИРОВАННЫМ ЭКСТРАКТОМ ПЫЛЬЦЫ БЕРЕЗЫ ПРИ ПОЛЛИНОЗАХ

Ю.А. Кадырова, А.А. Соловьёва

Ульяновский государственный университет, Ульяновск, Россия

**Введение:** Широкое распространение аллергических заболеваний, связанных с сенсибилизацией к пыльце деревьев диктует необходимость подбора эффективных методов лечения поллиноза. Одним из методов на современном этапе является аллерген специфическая иммунотерапия. Разновидностью данного вида лечения является суб-

лингвальный метод введения стандартизированного экстракта пыльцы березы. В настоящий момент кроме оценки клинической эффективности терапии, существует возможность использования функциональных методов, одним из них является доплерографическое исследование кровотока слюнных желез. В связи с этим, целью исследования явилось изучение клинической эффективности сублингвальной аллерген специфической терапии (СЛАСИТ) стандартизированным экстрактом пыльцы березы, в сопоставлении с доплерографической оценкой скорости кровотока слюнных желез.

**Материал и методы.** Наблюдались 124 пациента с сенсibilизацией к пыльце березы и имеющих клинические формы респираторной аллергии с клиническими проявлениями в сезон цветения березы. I группа – 66 человек, получающих СЛАСИТ стандартизированным экстрактом пыльцы березы, II группа 58 человек без СЛАСИТ, получающих стандартную патогенетическую терапию.

**Результаты.** У всех наблюдаемых пациентов отмечена сенсibilизация к пыльце березы,  $\frac{1}{3}$  из них имела перекрестную аллергию. Уже после 1 курса терапии в 88% случаев отмечено выраженное снижение симптомов аллергии в сезон поллинозиса. При доплерографическом исследовании у пациентов на фоне сублингвальной аллерген специфической терапии зарегистрировано выраженное усиление скорости кровотока подъязычной слюнной железы. Сравнительный анализ показал, что пациенты, получающие только патогенетическую терапию, не имели полного купирования симптомов поллиноза, а доплерографическое исследование кровотока подъязычной слюнной железы не выявило усиление кровотока.

**Выводы.** Сублингвальный метод проведения АСИТ стандартизированным экстрактом пыльцы березы эффективен и имеет предпочтение перед только патогенетической терапией. Критерием эффективности сублингвальной аллерген специфической терапии со стандартизированным экстрактом пыльцы березы может служить доступный метод – доплерографическое исследование кровотока подъязычной слюнной железы.

#### **МЕТАБОЛИЧЕСКАЯ КОРРЕКЦИЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ АЛЛЕРГИЧЕСКОЙ РЕАКЦИИ ПО ТИПУ ГИПЕРЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ НЕМЕДЛЕННОГО ТИПА**

**К.А. Попов, И.М. Быков**

*Кубанский государственный медицинский университет, Краснодар, Россия*

Для аллергических реакций наряду с классическими иммунологическими проявлениями характерны метаболические нарушения, в том числе развитие окислительного стресса. В связи с этим, актуальным представляется изучение возможностей использования средств антиоксидантной направленности с целью коррекции иммунных и окислительных нарушений. Исследование проведено на 75 белых крысах. Контрольную группу составили интактные животные. Животных II–V групп подвергли внутрибрюшинной иммунизации овальбумином. Крысы II группы не получали коррекции (группа сравнения). Животные III–V групп за месяц до начала и на протяжении всего эксперимента получали дихлорацетат натрия (ДХА, III группа), биологически активную добавку с антиоксидантным составом (БАД, EAN: 5907529461563, группа IV) или воду со сниженным содержанием дейтерия (DDW, 43 ppm, V группа). Все исследования проводились в соответствии с правилами, принятыми в Европейской конвенции по защите позвоночных животных. Развитие экспериментальной гиперчувствительности немедленного типа у животных II и IV групп сопровождалось увеличением продукции общего IgE в 6 раз (33,6 МЕ/мл), дисбалансом цитокинов с преобладанием Th2-цитокинового профиля (ИЛ4, ИЛ10) и снижением активности Th1-лимфоцитов (ИФН $\gamma$ , ИЛ2). Содержание IgE у животных группы III была выше контрольных значений на 46% (6,26 МЕ/мл), а в V группе значительно не отличалась. У животных III и V групп баланс Th1/Th2-цитокинов был смещен в сторону Th1, о чем свидетельствовало снижение ИЛ4 (в 5–6 раз) относительно II группы. При этом был увеличен уровень цитокинов Th1, уровень ИФН $\gamma$  превышал контрольные значения в 17–23 раза, усилилась продукция ИЛ2 (в 3–6 раз). У крыс IV группы наблюдалось увеличение в сравнении с контрольными показателями активности каталазы и глутатионпероксидазы на 17–20%, глутатионредуктазы – на 50%. Таким образом, исследуемая БАД подтвердила свои антиоксидантные свойства, между тем, положительного влияния на цитокиновый и иммуноглобулиновый профили она не оказывала. Введение крысам ДХА или DDW оказывало иммуномодулирующие эффекты, которые отменяли дисбаланс ИЛ4/ИФН $\gamma$  с нормализацией продукции IgE. Это имеет большое значение с позиции перспектив коррекции иммунологических нарушений при аллергических реакциях с помощью иммуномодуляторов патогенетического действия.

#### **IMPACT OF RADIOFREQUENCY ABLATION ON PLASMA CYTOKINES IN PATIENTS WITH UNRESECTABLE LIVER CANCER**

**K. Mazmishvili<sup>1</sup>, N. Kikodze<sup>1</sup>, I. Pantsulaia<sup>1</sup>, M. Iobadze<sup>2</sup>, M. Mizandari<sup>3</sup>, N. Janikashvili<sup>1</sup>, T. Chikovani<sup>1</sup>;**

<sup>1</sup>Department of Immunology, Tbilisi State Medical University; <sup>2</sup>V. Bakhtashvili Institute of Medical Biotechnology, Tbilisi State Medical University; <sup>3</sup>Department of Interventional Radiology, Tbilisi State Medical University, Tbilisi, Georgia

**Introduction:** Radiofrequency ablation is widely accepted interventional approach for liver cancer and has the advantages of high treatment efficacy and low complication risk. The various studies, including ours, have reported the immunomodulatory effects of RFA procedure on primary and metastatic liver cancer. The aim of this study was to explore the influence of RFA on the factors of tumor microenvironment including plasma cytokines. **Material and Methods:** 10 patients aged 39 to 72 years (mean 55.1 $\pm$ 11.2 years) with unresectable primary and metastatic hepatic tumors underwent RFA. Blood sam-

ples were collected from each patient and plasma cytokines (TGF- $\beta$ , IL-10, IL-17, INF $\gamma$ ), were measured before and after 1 and 3 month of RFA treatment. Healthy age-matched volunteers were used for group comparison. The Mann-Whitney U test, Mc Nemar test and Wilcoxon rank test were applied for intergroup comparisons as appropriate. **Results:** Serum IL-17, IL-10 and TGF- $\beta$  levels were elevated in the patients with liver cancer compared to healthy volunteers. Decreased IL-10 and INF $\gamma$  levels were reported after 1 and 3 months of RFA procedure, whilst there were not a significant changes in TGF- $\beta$  and IL-17 levels after RFA treatment. **Conclusion:** Changes in plasma cytokine levels in patients treated with RFA further edits the evidence on the immunomodulatory effects of RFA on tumor microenvironment.

#### THE ROLE OF GROWTH FACTORS IN THE PATHOGENESIS OF ASTHMA IN CHILDREN: GENETIC AND CLINICAL ASPECTS

O.E. Semernik, A.A. Lebedenko, D.N. Ivanova

Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russia

Bronchial asthma (BA) is a multifactorial disease that is caused by a complex of neurohumoral and genetic factors. A special role in its pathogenesis is played by tissue growth factors: transforming growth factor  $\beta$ 1 (TGF  $\beta$ 1) and vascular endothelial growth factor (VEGFA), which has a significant impact on the processes of maintaining and inhibiting allergic inflammation in the respiratory tract. Therefore, the study of changes in the concentration of these factors in the blood serum and features of their inheritance is of great scientific and practical interest. Analysis of associations of polymorphic loci of the gene Arg25Pro C634G TGF  $\beta$ 1 and VEGFA gene with the risk of developing the disease were conducted to assess the involvement of genes of growth factors in the pathogenesis of BA. DNA samples were isolated from peripheral blood leukocytes of 30 patients with BA and 27 children of I and IIA health groups. Determination of polymorphic variants of the studied genes was carried out by the method of Allel-specific polymerase chain reaction using sets of SNP-Express reagents. Blood tests for immunological parameters were performed by enzyme immunoassay using human TGF beta 1 Platinum ELISA and Human VEGF-a Platinum ELISA kits (Austria). It was found that in children with BA the concentration of TGF  $\beta$ 1 ( $116.21 \pm 51.59$  PG/ml) was significantly increased, compared with the control group –  $2.70 \pm 0.12$  PG/ml ( $p=0.01$ ). There was also an increase in the level of VEGFA in the blood serum of patients ( $133.59 \pm 19.53$  PG/ml). The level of tissue growth factors correlates with the severity of the disease and the indicators of respiratory function. The identified association of SNPs Arg25Pro and Tgfb1 gene polymorphism C634G VEGFA gene with an increased risk of developing the disease. Frequency of alleles and genotypes Arg25Pro gene of TGF- $\beta$ 1 in patients with BA were statistically significantly different from children in the control group ( $\chi^2$  0,05). It is established that the genotype ArgArg of the gene TGF- $\beta$ 1 is associated with increased risk of development of BA in children (OR made up 5.38). The obtained data allow to diagnose the predisposition to BA and to develop a set of preventive measures taking into account the individual characteristics of each patient.

#### STRATIFICATION AND TREATMENT OF NON TYPE - 2 SEVERE ASTHMA

Akshay Singh

New Vision University, Tbilisi, Georgia

According to GINA Asthma is defined by history of Respiratory symptom that vary under time and in intensity, with variable airflow limitation. Asthma is problem for all country regardless of level of development. But most asthma related deaths occur in lower and lower-middle income country. Risk factor for developing asthma are inhaled substance and particles that provoke allergic reaction. T2-low asthma? Pancgranulocytic asthma & Neutrophilic asthma. Have late onset, not effected by presence of possible allergen, low FEV, more air trapping. Biomarkers are No increase in IgE, Lower FeNO level ( $<25$  ppb), higher level on IL17 and Th17 but no Th2 biomarker. Diagnostic test is different like FeNO level (Differentiate b/w Th2 low or Th2 high asthma), Spirometer, Chest XR, Sputum analysis. For treatment ICS and LABA are less effective and microlides reduce neutrophilia associated airways inflammation. New Generation Drugs are there like Biologics that is medical product made from variety of natural source, use to treat or cure medical conditions. Such as Amalizumab (for Anti IgE), Reslizumab and Mepolizumab ( for Anti ILS). Macrolides are also use for adult with persistent symptomatic asthma. Thromboplastic can be use but in very few selected patients. Conclusion:  $\cup$  Diagnosis and treatment for Th2-low phenotype is different  $\cup$  Paucigranulocytic asthma is usually the expression of controlled inflammation. Severe patients with paucigranulocytic asthma should be treated with triple therapy and eventually with thermoplasty  $\cup$  Neutrophilic asthma is often severe and unresponsive to conventional therapy. Treatment of neutrophilic asthma should be chosen according individual objectives and treatable traits.  $\cup$  Azithromycin is a good option for those with persisting exacerbations.  $\cup$  Thermoplasty can be attempted in refractory patients.

#### ALLERGIC RHINITIS, BRONCHIAL ASTHMA, ATOPIC DERMATITIS IN CHILDREN'S POPULATION.

Levan Chelidze, Natia Chkhaidze, Nino Nanava, Levan Kharashvili, Koba Kirtadze, Giorgi Khurtsidze, Ani Robakidze, Maia Matoshvili, Nino Adamia, Davit Tophuria

Tbilisi State Medical University, M. Iashvili Central Pediatric Hospital, Tbilisi, Georgia; Tskaltubo Research Institute of Allergy, Asthma and Clinical Immunology, National Academy of Sciences, Tbilisi, Georgia

**Goal of the work** included study of prevalence of allergic diseases and risk factors in the children's populations of Georgia (2017-2018).

**Materials and methods of research.** Group to be studied included 899 children from 1- to 14 (girls – 51.8%; boys – 48.2%). At the first stage of epidemiological study the large-scale work was performed, including screening of 1899 children through questionnaire completed directly at a time of interviews with the parents. Information was further specified through telephone interviews. Key data of the screening questionnaire were directed towards initial diagnostics of allergic diseases. At the same time, the screening questionnaire implied, at the first (population) stage of the studies possibility of identification of the potential risk factors (questionnaire included information about obstetrics anamnesis, data about child's development before one-year age and further etc.) and these data were further specified more precisely through expanded questionnaire of epidemiological study of allergic diseases. On the second stage of epidemiological studies part of the patients with allergic diseases (315 children) were subjected to clinical-allergological study. At the same stage external respiratory function was studied, general IgE level in the blood and prick-testing was conducted, study of external respiration function. At the last stage of epidemiological and clinical-laboratory study mathematical-statistical data processing was provided by means of software SPSS/V12.5 (Statistical Package for Social Sciences).

**Results.** Screening showed general characteristics of the studied population. In the population number of girls exceeded the one of boys ( $p < 0.001$ ), especially within the age group from 7 to 14 years. According to the results of questioning, for 12 months, symptoms of allergic rhinitis (rhinorrhea, sneezing, nose itch, nasal obstruction and eyes' itch) were identified in 16.7 of population ( $p < 0.05$ ); symptoms of bronchial asthma (wheezing (9%), coughing episodes at night (5.7%), intolerance to physical load (3.9%), indoor and outdoor episodes (11.2%), episodes of coughing and rales in response to stimulus (7.2%)) were identified in 9.8% of the population; atopic dermatitis (dermatitis, itch, revelation in early age, involvement of large areas in early age, damage of extremities bending and stretching surfaces in adults) – 4.9% ( $p < 0.01$ ); food allergy – 9.7% ( $p < 0.001$ ) etc.

At the second stage of clinical studies, on the basis of prick-testing, average IgE, in our case, was 1-4 times greater than normal level. Results of study of allergens showed sensibilization to domestic dust (D.F. and D.P.) (75, 04%) ( $p < 0.05$ ). In 24.96% of cases there was stated sensibilization conditioned by cat and dog epidermal allergens

**Conclusion:** In development of allergic diseases share of controllable risk factors is quite high and this could provide basis for development of targeted and effective prevention measures in children's population.

#### MOLECULAR, STRUCTURAL AND IMMUNOLOGICAL CHARACTERIZATION OF THE RECOMBINANT WILD-TYPE-LIKE VERSIONS OF THE MAJOR PARIETARIA ALLERGENS, PAR J 1 AND PAR J 2.

Y. Dorofeeva<sup>1</sup>, P. Colombo<sup>2</sup>, M. Blanca<sup>3</sup>, A. Mari<sup>4</sup>, R. Valenta<sup>1</sup>, M. Focke-Tejkl<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Pathophysiology and Allergy Research, Center of Pathophysiology, Infectiology and Immunology, Medical University of Vienna, Austria <sup>2</sup>Istituto di Biomedicina ed Immunologia Molecolare "Alberto Monroy" del Consiglio Nazionale delle Ricerche, Via Ugo La Malfa 153, Palermo, Italy and <sup>3</sup>Hospital Civil, Malaga, Spain <sup>4</sup>Associated Centers for Molecular Allergy, Rome, Italy

*Parietaria judaica* is one the most common pollen allergen sources in the Mediterranean area. Par j 1 and Par j 2, the major *Parietaria* allergens, belong to the family of lipid-transfer proteins. The aim of this study was to express and purify correctly folded recombinant Par j 1 and Par j 2 molecules which would mimic the structural and immunological features of the natural allergens. We compared the recombinant Par j 2 (BvPar j 2) and Par j 1 (BvPar j 1) obtained by expression using baculovirus infected insect cells and Par j 2 expressed in bacterial expression system using *Escherichia coli* cells (EcPar j 2). Analysis by CD showed that BvPar j 2 and BvPar j 1 assumed mainly  $\alpha$ -helical structure whereas EcPar j 2 contained mainly unordered species. IgE reactivity of the EcPar j 2 and BvPar j 2 proteins was tested using sera from 27 *Parietaria* allergic patients. BvPar j 2 showed significantly higher IgE reactivity than EcPar j 2. Rat basophil leukemia cells transfected with human FcεRI receptor were used to compare the allergenic activity of various concentrations of BvPar j 1, BvPar j 2 and EcPar j 2 in terms of their capability to induce mediator release in 9 allergic donors. The data demonstrated that all three recombinants show allergenic activity and are capable to induce basophil degranulation. However BvPar j 2 is potent already in 100 fold lower concentration than EcPar j 2. To find the capability of BvPar j 1 and BvPar j 2 to inhibit IgE binding of allergic patients to *Parietaria judaica* pollen extract we tested sera of 9 allergic patients in ELISA inhibition. We have seen a significant prevalence in inhibition potency of BvPar j 2 over BvPar j 1. This study shows that IgE recognition of the main allergen of *Parietaria judaica* pollen requires conformational epitopes. By the eukaryotic expression of Par j 1 and Par j 2 in insect cells it was possible to obtain folded recombinant proteins with superior IgE reactivity over *E. coli* expressed Par j 2. BvPar j 1 and BvPar j 2 can now be used for IgE-based diagnostic testing for identifying *Parietaria* allergic patients. Furthermore, RBL assay and inhibition experiments widen the overview of significance of the major *Parietaria* allergens. These findings can be important for the development of allergen-specific treatment.

#### DER P 1, DER P 2, DER P 23 -HOUSE DUST MITE MAJOR ALLERGENS SENSITIZATION PROFILE IN A PORTUGUESE POPULATION

Filipa Semedo, Elza Tomaz, Ana Paula Pires, Filipe Inácio

Hospital de São Bernardo, Centro Hospitalar de Setúbal E.P.E, Setúbal, Portugal; Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade da Beira Interior, Covilhã, Portugal

**Introduction:** House dust mites (HDM) represent one of the most important inducers of respiratory allergies worldwide, 85% of allergic asthmatic children being sensitized and higher specific IgE levels being related to likelihood of developing asthma and its severity.

**The aim of this study** is to characterize a Portuguese population of HDM allergic patients concerning major allergens sensitization profile and its clinical relevance.

**Methods:** Sera of 98 paediatric and adult HDM-allergic patients, living in different country areas, with positive IgE to *Dermatophagoides pteronyssinus* total extract, were tested for Der p 1, Der p 2 and Der p 23 reactivity. Chi-square Test was used to compare frequencies and T Test to mean IgE values.

**Results:** All patients had allergic rhinitis, 81% also asthma. Prevalence of IgE to each Der p 1, Der p 2 and Der p 23 was >85%. Overall, 73 patients were sensitized to all three components, 16 to only two, 5 to just one (Der p 23 in 4 of them) and 4 to none. Patterns of IgE to Der p 2 and Der p 23 were similar encompassing adults and children, but Der p 1 reactivity was more frequent in children (91% vs 70%,  $p=0,032$ ). Also in paediatric group, mean IgE values were higher to all components, being significant for Der p 1 and total Der p (56 vs 11 kUA/l,  $p=0,012$ ; 109 vs 48 kUA/l,  $p=0,018$ ). No sex-related difference was found. Asthmatic patients in general had more frequent IgE response to Der p 1 (91%) and Der p 2 (89%), than nonasthmatics (68%; 68%, respectively:  $p=0,009$ ;  $p=0,028$ ). They also had higher mean IgE levels for total Der p (108 vs 56 kUA/l,  $p=0,045$ ). Asthmatic children who had started symptoms after 3 years old (32%) showed IgE values significantly higher than the others (Der p 1,  $p=0,001$ ; Der p 2 and Der p 23,  $p=0,005$ ). Furthermore, IgE levels to total Der p and Der p 2 were higher in children with more severe asthma ( $p=0,007$ ;  $p=0,045$ ).

**Conclusion:** High IgE binding to Der p 23 was in accordance to most of studies. Also, subjects without IgE to Der p 1 or 2 had IgE against Der p 23. Children were more frequently sensitized and had higher IgE to Der p 1. Asthma was related to more frequent and higher recognition of Der p 1 and 2 and severity in children seemed associated to higher levels to total Der p and Der p 2.

**РАСПИСАНИЕ  
ЦИКЛОВ ПОВЫШЕНИЯ КВАЛИФИКАЦИИ  
ВРАЧЕЙ РАЗЛИЧНЫХ СПЕЦИАЛЬНОСТЕЙ И МЕДСЕСТЕР  
НА КАФЕДРЕ АЛЛЕРГОЛОГИИ И ИММУНОЛОГИИ  
РОССИЙСКОГО УНИВЕРСИТЕТА ДРУЖБЫ НАРОДОВ (2018–2019)**

| <i>№№<br/>n/n</i> | <i>Наименование<br/>учебного цикла</i>                                                                                                                                                                                                    | <i>Сроки<br/>проведения</i>                                                                                                                                                          | <i>Выдаваемый<br/>документ</i>                                        |
|-------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|
| 1                 | <b>Первичная специализация по АЛЛЕРГОЛОГИИ И ИММУНОЛОГИИ</b> для лиц с высшим медицинским образованием (576 часов)                                                                                                                        | с 15.10.2018<br>с 18.11.2018<br>с 11.02.2019<br>с 01.04.2019<br>с 13.05.2019<br>с 09.09.2019<br>с 14.10.2019<br>с 18.11.2019                                                         | Государственный диплом о переподготовке и сертификат                  |
| 2                 | <b>Первичная специализация по ПУЛЬМОНОЛОГИИ</b> для лиц с высшим медицинским образованием (576 часов)                                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                      | Государственный диплом о переподготовке и сертификат                  |
| 3                 | <b>Первичная специализация по КЛИНИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ</b> (лабораторная иммунология для лиц с высшим медицинским и биологическим образованием) (576 часов)                                                                   |                                                                                                                                                                                      | Государственный диплом о переподготовке, сертификат или удостоверение |
| 4                 | <b>Сертификационный цикл по АЛЛЕРГОЛОГИИ И ИММУНОЛОГИИ</b> для лиц с высшим медицинским образованием                                                                                                                                      | 15.10.2018-15.11.18<br>18.11.2018-18.12.18<br>11.02.2019-11.03.19<br>01.04.2019-30.04.19<br>13.05.2019-13.06.19<br>09.09.2019-09.10.19<br>14.10.2019-14.11.19<br>18.11.2019-18.12.19 | Сертификат                                                            |
| 5                 | <b>Сертификационный цикл по ПУЛЬМОНОЛОГИИ</b> для лиц с высшим медицинским образованием                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                                                      | Сертификат                                                            |
| 6                 | <b>Сертификационный цикл «КЛИНИЧЕСКАЯ ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА»</b> (лабораторная иммунология для лиц с высшим медицинским и биологическим образованием)                                                                                  |                                                                                                                                                                                      | Сертификат                                                            |
| 7                 | <b>Сертификационный цикл «СЕСТРИНСКАЯ ПОМОЩЬ БОЛЬНЫМ С АЛЛЕРГИЧЕСКИМИ И ИММУНО-ДЕФИЦИТНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ»</b> для медсестер аллергических кабинетов и отделений клинической иммунологии ЛПУ                                               |                                                                                                                                                                                      | Сертификат                                                            |
| 8                 | <b>Сертификационный цикл «КЛИНИЧЕСКАЯ ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА»</b> (лабораторная иммунология и аллергология) для фельдшеров и лаборантов со средним специальным образованием                                                             |                                                                                                                                                                                      | Сертификат                                                            |
| 9                 | <b>Тематическое усовершенствование «Аллергология и иммунология для клиницистов»</b> (для врачей любых специальностей)                                                                                                                     | 15.10.2018-25.10.18<br>18.11.2018-28.11.18<br>11.02.2019-21.02.19<br>01.04.2019-11.04.19<br>13.05.2019-23.05.19<br>09.09.2019-19.09.19<br>14.10.2019-24.10.19<br>18.11.2019-28.11.19 | Удостоверение                                                         |
| 10                | <b>Тематическое усовершенствование «Аллергенспецифическая иммунотерапия»</b> для врачей                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                                                      | Удостоверение                                                         |
| 11                | <b>Тематическое усовершенствование «Актуальные вопросы вакцинации»</b> для врачей (базисные знания о формировании поствакцинального иммунитета, современных вакцинах, поствакцинальных осложнениях, календарь прививок, противопоказания) |                                                                                                                                                                                      | Удостоверение                                                         |
| 12                | <b>Тематическое усовершенствование «Актуальные вопросы вакцинации»</b> для медсестер                                                                                                                                                      |                                                                                                                                                                                      | Удостоверение                                                         |
| 13                | <b>Тематическое усовершенствование «Герпесвирусные инфекции: патогенез, лабораторная диагностика, иммунотерапия и химиотерапия, иммунореабилитация»</b>                                                                                   |                                                                                                                                                                                      | Удостоверение                                                         |
| 14                | <b>Тематическое усовершенствование «Современные взгляды на патогенез, лечение и профилактику бронхиальной астмы»</b>                                                                                                                      |                                                                                                                                                                                      | Удостоверение                                                         |

| <b>№№<br/>n/n</b> | <b>Наименование<br/>учебного цикла</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | <b>Сроки<br/>проведения</b>                                                                                                                                                          | <b>Выдаваемый<br/>документ</b> |
|-------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|
| 15                | Тематическое усовершенствование «Синдром хронической усталости: патогенез, иммунодиагностика, иммунотерапия, иммуно-реабилитация»                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 15.10.2018-25.10.18<br>18.11.2018-28.11.18<br>11.02.2019-21.02.19<br>01.04.2019-11.04.19<br>13.05.2019-23.05.19<br>09.09.2019-19.09.19<br>14.10.2019-24.10.19<br>18.11.2019-28.11.19 | Удостоверение                  |
| 16                | Тематическое усовершенствование «Иммунологические аспекты диагностики, лечения и реабилитации часто и длительно болеющих лиц»                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                                                                                                                                      | Удостоверение                  |
| 17                | Тематическое усовершенствование «Стратегия и тактика иммунореабилитации»                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                                      | Удостоверение                  |
| 18                | Тематическое усовершенствование «Иммуномодулирующая терапия в клинике внутренних болезней»                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                      | Удостоверение                  |
| 19                | Тематическое усовершенствование «Современные методы лечения аллергических заболеваний»                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                                      | Удостоверение                  |
| 20                | Тематическое усовершенствование «Современные методы оценки иммунного статуса»                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | по согласованию<br>(рабочее место)                                                                                                                                                   | Удостоверение                  |
| 21                | Тематическое усовершенствование «Современные методы аллергодиагностики»                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                                                      | Удостоверение                  |
| 22                | Тематическое усовершенствование «ПЦР-диагностика в медицине»                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                                                                                                                                                      | Удостоверение                  |
| 23                | Тематическое усовершенствование «Иммуноферментный анализ»                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                                                                                                                      | Удостоверение                  |
| 24                | <b>Однодневные семинары по тематическим циклам:</b><br>– Роль и место интерфероно- и иммунотерапии в медицине<br>– Иммуномодулирующая терапия в клинике внутренних болезней: когда и как?<br>– Первичные и вторичные иммунодефициты. Проблемы диагностики и иммунотерапии<br>– Особенности вакцинации при первичных и вторичных иммунодефицитах<br>– Бронхиальная астма. Современные стратегии достижения контроля<br>– Аллергический ринит. Новые подходы к терапии<br>– Аллерген-специфическая иммунотерапия<br>– Современные подходы к использованию иммуномодуляторов в аллергологической практике<br>– Новое в вакцинопрофилактике. Вакцинопредотвратимые заболевания<br>– Иммуномодулирующие аспекты антибактериальной терапии<br>– Антигистаминные препараты во врачебной практике<br>– Патология иммунитета слизистых. Пути коррекции. Выбор иммуностропного препарата<br>– Иммуностропная терапия при ОРЗ. Взгляд иммунолога<br>– Как поднять иммунитет или неопределенные возможности иммунитета слизистых<br>– Атопический дерматит: патогенез, диагностика и современные принципы лечения<br>– Перспективы использования иммуномодуляторов в дерматологии и эстетической медицине<br>– Иммуностропные препараты в пластической и реконструктивной хирургии<br>– Иммуномодулирующая терапия в гинекологической практике | по согласованию                                                                                                                                                                      | Удостоверение                  |

*По всем вопросам повышения квалификации Вам необходимо послать заявку на имя профессора кафедры Славянской Татьяны Александровны по адресу:*



**Институт иммунофизиологии  
Кафедра аллергологии и иммунологии РУДН  
117513 Москва, ул. Островитянова, 4**



**+7 (495) 735-1414**

**Факс:**

**+7 (495) 735-1414**

**E-mail:**

**info@wipocis.org**

*Справки по телефону +7 (495) 735-1414 или электронной почте info@wipocis.org*

# www.isir.ru