



№ 2/1 (24), 2009 г.

# ВЕСТНИК УРАЛЬСКОЙ МЕДИЦИНСКОЙ АКАДЕМИЧЕСКОЙ НАУКИ.

## Тематический выпуск по аллергологии и иммунологии

**Главный редактор:**

В.А. Черешнев, академик РАН и РАМН (г. Екатеринбург)

**Заместители главного редактора:**

В.Г. Климин, д.м.н., профессор (г. Екатеринбург); С.М. Кутепов, д.м.н., профессор (г. Екатеринбург);  
Б.Г. Юшков, д.м.н., профессор (г. Екатеринбург)

**Ответственный секретарь:**

С.Л. Леонтьев, д.м.н., профессор (г. Екатеринбург)

**Редакционная коллегия:**

Н.А. Агаджанян, академик РАМН (г. Москва); Ф.И. Бадаев, д.м.н. (г. Екатеринбург);  
А.Б. Блохин, д.м.н., профессор (г. Екатеринбург); В.Н. Большаков, академик РАН (г. Екатеринбург);  
О.В. Бухарин, член-корреспондент РАН, академик РАМН (г. Оренбург);  
А.М. Дыгай, академик РАМН (г. Томск); В.Н. Журавлев, д.м.н., профессор (г. Екатеринбург);  
Н.В. Зайцева, член-корреспондент РАМН (г. Пермь); Ю.М. Захаров, академик РАМН (г. Челябинск);  
О.П. Ковтун, д.м.н., профессор (г. Екатеринбург); М.И. Прудков, д.м.н., профессор (г. Екатеринбург);  
К.В. Судаков, академик РАМН (г. Москва); Р.М. Хаитов, академик РАМН (г. Москва);  
М.В. Черешнева, д.м.н., профессор (г. Екатеринбург);  
В.И. Шевцов, член-корреспондент РАМН (г. Курган);  
А.П. Ястребов, член-корреспондент РАМН (г. Екатеринбург)

**Редакционный совет:**

Я.Б. Бейкин, д.м.н., профессор (г. Екатеринбург); А.А. Белкин, д.м.н., профессор (г. Екатеринбург);  
С.А. Берзин, д.м.н., профессор (г. Екатеринбург); Ф.Х. Камилов, д.м.н., профессор (г. Уфа);  
Б.А. Кацнельсон, д.м.н., профессор (г. Екатеринбург); Л.А. Ковальчук, д.б.н. (г. Екатеринбург);  
С.А. Коротких, д.м.н., профессор (г. Екатеринбург); А.И. Кузьмин, к.м.н., доцент (г. Екатеринбург);  
С.В. Кузьмин, д.м.н. (г. Екатеринбург); Л.П. Ларионов, д.м.н., профессор (г. Екатеринбург);  
Г.И. Ронь, д.м.н., профессор (г. Екатеринбург)



содержание АТФ в клетках в условиях «химической гипоксии» до уровня контроля (с цельной КС) обладает исключительно фильтрат CF25, содержащий молекулы с молекулярной массой менее 25 кДа.

Для проведения дальнейшего анализа молекул АФ, содержащихся в КС клеток CTLL-2 и ответственных за восстановление энергетического метаболизма в условиях гипоксии, была использована процедура гель-фильтрации на колонке. В качестве носителя был выбран гель «Bio-Gel P-10», для которого характерен диапазон разделения глобулярных белков от 1,5 до 20 кДа. В результате проведения гель-фильтрации КС были получены три фракции (А, В и С), соответствующие на хроматограмме трем отдельным пикам протеиновых молекул. Фракция А выходила из колонки в свободном объеме, она содержала самые крупные молекулы. Полученные фракции смешивали со средой на основе среды RPMI-1640 в соотношении 1:1 с добавлением 5% сыворотки. Вместе с 10 мМ Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> и 100 ед./мл ИЛ-2 разбавленные фракции добавляли к клеткам CTLL-2 и инкубировали в течение 1 ч, а затем определяли в них содержание АТФ. Оказалось, что способностью предотвращать снижение уровня АТФ в клетках CTLL-2 при «химической гипоксии» обладает только фракция В, остальные фракции такой способностью не обладали.

Для получения физико-химических характеристик АФ, содержащихся во фракциях КС, полученных с помощью гель-фильтрации, мы провели электрофорез в полиакриламидном геле в двух вариантах: в системе глицин-ДСН (для фракции А) и трицин-ДСН (для фракций В и С). Глицин-ДСН электрофорез в полиакриламидном геле фракции А выявил наличие 3-х полос, соответствующих протеинам с молекулярными массами 43 — 67 кДа. Трицин-ДСН электрофорез в полиакриламидном геле показал, что фракции В и С, полученные гель-фильтрацией КС, являются гомогенными и содержат по одному виду молекул. Масса молекул из фракции В находится в интервале 3,5 — 6,3 кДа, а масса молекул из фракции С оказалась близкой к 3,5 кДа.

Для получения более точных оценок молекулярных масс АФ был использован хроматографический метод на носителе «Bio-Gel P-10» с использованием маркерных протеинов для построения калибровочной прямой. В качестве маркерных протеинов были использованы инсулин (5,75 кДа) и синтетические пептиды, любезно предоставленные И.А. Костянян (лаборатория белков гормональной регуляции ИБХ РАН), с молекулярными массами: 712, 984 и 3047 Да. Определенные с использованием метода линейной регрессии массы молекул, содержащихся во фракциях В и С, составили 4,9 и 3,8 кДа соответственно. Эти данные хоро-

шо согласуются с оценками, полученными методом триацин-электрофореза.

Таким образом, в данной работе обнаружен аутокринный фактор с молекулярной массой 4,9 кДа, который стимулирует клетки линии CTLL-2 и в условиях гипоксии способствует восстановлению уровня АТФ в клетках посредством активации анаэробного гликолиза, тем самым принимая участие в механизме адаптации клеток к условиям гипоксии.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 08-04-00000).

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Vander Heiden M.G., Plas D.R., Rathmell J.C. et al. // *Mol. Biol.* — 2001. — V. 21. — P. 5899 — 5912.
2. Ishizaki Y., Burne J.F., Raff M.C. // *J. Cell Biol.* — 1994. — № 4. — P. 1069 — 1077.
3. Луценко Г.В., Гречихина М.В., Дьячкова Л.Г. // *Иммунология* — 2005. — Т. 26, № 2. — С. 91 — 95.
4. Caldwell C.C., Kojima H., Lukashev D. et al. // *J. Immunol.* — V. 167. — P. 6140 — 6149.
5. Greiner E.F., Guppy M., Brand K. // *J. Biol. Chem.* — 1979. — P. 31484 — 31490.
6. Ohmori H. // *J. Immunol. Meth.* — 1988. — V. 112. — P. 227 — 233.

### Grechikhina M.V., Diachkova L.G., Lutsenko L.G. AUTOCRINE FACTOR PARTICIPATION IN MECHANISM OF CTLL-2 CELL ADAPTATION TO HYPOXIA CONDITIONS

We studied the role of autocrine factors (AF) in the regulation of ATP level in cytotoxic CTLL-2 cells cultivated under «chemical hypoxia» conditions (10 mM Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>). ATP content in CTLL-2 cells under hypoxia conditions has been shown to go down to 36 — 42% of control level. The addition of 50% conditioned medium (CM) to cell culture including AF, prevented decrease of ATP level. After separation of CM by means of gel filtration we have obtained fractions including different protein molecules. One fraction has been shown to have ability to prevent ATP decrease in CTLL-2 cells under «chemical hypoxia». Molecular mass of autocrine factor obtained into the fraction was determined by means of SDS electrophoresis in polyacrylamide gel and chromatographic method as 4.9 kDa.

УДК 616-097

Долгих О.В., Зайцева Н.В., Кривцов А.В., Землянова М.А., Алексеев В.Б., Кирьянов Д.А., Лопухов С.С., Щербина С.Г., Пустовалова О.В.

### ИММУНИТЕТ У ДЕТЕЙ В УСЛОВИЯХ ЭКСПОЗИЦИИ К СЕНОГЕННЫМ СОЕДИНЕНИЯМ

ГУЗ «Пермский краевой научно-исследовательский клинический институт детской экопатологии»

#### Резюме

Данная статья посвящена диагностике особенностей состояния противовирусного иммунитета в условиях комбинированного воздействия химических и биологических факторов. Исследована зависимость между содержанием специфических иммуноглобулинов к различным видам герпесвирусов и показателями, отражающими контаминацию биосред (содержание свинца, марганца, меди, хрома, никеля и цинка в крови) у детей, проживающих на экологически неблагоприятных территориях Пермского края с различной интенсивностью техногенного загрязнения. Изучены механизмы формирования противовирусного иммунитета у детского населения в зависимости от особенностей контаминации биосред. Предложена и обоснована диагностическая тест-система, позволяющая оценить влияние токсикантов на противогерпетический иммунитет.

Ключевые слова: герпетическая инфекция, противогерпетический иммунитет у детей, малоновый диальдегид, контаминация биосред.

Актуальность. В настоящее время в мире отмечается увеличение заболеваемости инфекциями, вызванными вирусами семейства *Herpesviridae* [3]. В то же время иммунопатология в результате действия негативных техногенных факторов выявлена у 60 % населения [1]. Наиболее чувствительным к воздействию неблагоприятных факторов окружающей среды является детское население [4]. Очевидно, что иммунный статус из основных объектов воздействия как герпетической инфекции, так и компонентов загрязнения окружающей среды. Поэтому разработка методов, позволяющих выявлять концентрацию токсикантов и специфических противогерпетических антител, представляется возможным проведение



эффекта воздействия химических и биологических факторов на формирование противогерпетического иммунитета. Цель работы — оценка состояния противогерпетического иммунитета у детей в условиях комбинированного воздействия химических и биологических факторов.

#### Материалы и методы

Исследованы иммунологические, биохимические и химико-исследовательские данные у 250 детей, относящихся к диспансерной группе часто болеющих. Дети распределены на две группы по уровню витаминизации биосред: основную группу (202 человека), состоящую из детей с наличием истинных ксенобиотиков и тяжелых металлов в биосредах на уровне, достоверно превышающем уровень группы сравнения; группу сравнения (48 человек), состоящую из детей с содержанием металлов на уровне фоновых значений, установленных для региона, или физиологических значений при отсутствии ксенобиотиков в биосредах.

Для исследования использовались следующие иммунологические методы: определение показателей клеточного иммунофенотипирования (CD3+, CD4+, CD8+, CD20+, CD16+, CD95+) иммунохимическим методом с использованием моноклональных антител и биотин-стрептавидиновой визуализирующей системы фирмы DAKO (Дания); исследование системы общего фагоцитоза с использованием в качестве объектов фагоцитоза инкубированных эритроцитов барана; изучение содержания сывороточных иммуноглобулинов методом радиальной иммунодиффузии по Манчини; анализ содержания специфических антител к вирусным (ВПГ, ЦМВ) антигенам производили методом иммуноферментного анализа с использованием тест-систем «Вектор-Бест» (Новосибирск); идентификация медиаторов клеточной иммунной регуляции — маркеров цитокинового каскада (IL-4,  $\gamma$ -INF) осуществлялась методом иммуноферментного анализа с использованием тест-систем ООО «Цитокин» на анализаторе «Stat Fax-2100». Исследование крови на содержание тяжелых металлов (никеля, хрома, марганца, свинца, меди, цинка) выполнялось атомно-абсорбционным методом (Perkin Elmer, 3110). Определение органических соединений (предельные одноатомные спирты, альдегиды, ароматические углеводороды) проводилось методом газовой и жидкостной хроматографии.

#### Основные результаты

Анализ содержания в биоматериалах металлов, обладающих иммуотропным эффектом, выявил достоверно высокие по отношению к группе сравнения концентрации свинца у детского населения городов Кизеловского угольного бассейна (гг. Кизел, Александровск), диапазон превышения составил 1,9 — 2,4 раза ( $p < 0,05$ ). Установлены повышенные концентрации ряда тяжелых металлов в крови у детей, проживающих в зонах влияния предприятий металлургической, химической и горнодобывающей отраслей (Губаха, Чусовой — медь, Горнозаводск — никель, хром, свинец — свинец, хром), диапазон превышения по отношению к группе сравнения составил 1,6 — 3,1 раза ( $p < 0,05$ ). Установлены повышенные концентрации метилового спирта в крови детского населения г. Губаха (превышение показателей группы сравнения — в 5,5 раза).

Установлены особенности модифицирующего влияния различной по составу гаптенной нагрузки (содержание в крови свинца, хрома, марганца, формальдегида, фенола, метанола) на состояние иммунитета: дефицит абсолютного и относительного числа CD3 и CD4 позитивных лимфоцитов, относительного содержания цитотоксических лимфоцитов и естественных киллеров (CD16+ лимфоцитов), увеличение относительного количества CD20+ лимфоцитов, повышение ИЛ-4, снижение  $\gamma$ -интерферона.

Выявлены повышенные по отношению к группе сравнения изменения содержания специфических Ig G к ВПГ у детей, проживающих в городе Чусовой с развитой металлургической промышленностью, что можно объяснить сочетанным воздействием вирусной и токсикантной нагрузки, преимущественно

иммуотропного характера. Пониженным уровнем противогерпетического иммунитета по критерию Ig G к ВПГ и ЦМВ отличаются дети, проживающие на территориях, где размещены предприятия горнодобывающей, нефтеперерабатывающей и химической промышленности (Березники, Краснокамск, Соликамск) ( $p < 0,05$ ), что вероятно указывает на низкую общую иммунную резистентность, способствующую росту вирусоносительства.

Установлена отрицательная зависимость содержания Ig G к ВПГ от концентрации фенола ( $r = -0,25$ ,  $p < 0,05$ ), а также достоверная отрицательная взаимосвязь между показателями противовирусного иммунитета (Ig G к ВПГ и ЦМВ) и концентрацией формальдегида в крови ( $r = 0,44-0,64$ ). Отмечается прямая достоверная взаимосвязь между содержанием тяжелых металлов (свинца, никеля, марганца, хрома) в крови детей и Ig G к ВПГ и ЦМВ. Изучение особенностей взаимосвязи специфических противовирусных антител с концентрациями в крови иммунопротективных элементов — цинка и меди позволило выявить стимулирующее действие цинка ( $r = 0,28-0,38$ ) и варибельность взаимосвязи специфического иммунитета с медью ( $r = 0,31-0,45$ ).

Установлены достоверные взаимосвязи в системе «показатели противогерпетического иммунитета — показатели антиоксидантной защиты» ( $r = 0,36-0,55$ ;  $p < 0,05$ ).

В эксперименте на лабораторных животных выявлено снижение содержания а-токоферола в клетках крови у больных герпетическим кератитом, что отражает нарушение неферментативного звена антиоксидантной защиты при герпетической инфекции, снижение активности мембраносвязанных ферментов — щелочной фосфатазы, АТФазы свидетельствует о нарушении лигандсвязывающей функции липидов в мембранах лимфоцитов, нейтрофилов и эритроцитов, что подтверждается повышением содержания холестерина в клетках и сыворотке крови у кроликов и крыс при экспериментальном офтальмогерпесе и снижением в них фосфолипидов. Выявленные в эксперименте изменения в метаболизме клеток при герпетической инфекции, отражают тонкие механизмы формирования нарушений противовирусного иммунитета под воздействием химической нагрузки.

Таким образом, преимущественная контаминация биосред тяжелыми металлами приводит к снижению клеточного противовирусного иммунитета с переключением Т-клеточной регуляции с Th1 на Th2 тип и увеличению антителпродуцирующих клеток. В то же время экспозиция липотропных органических контаминантов приводит к снижению уровня специфических противогерпетических глобулинов и прямому повреждающему воздействию на клеточную мембрану, снижая ее антиоксидантный потенциал и потенцируя образование недоокисленных метаболитов (малоновый диальдегид). Результаты изучения специфических (специфические иммуноглобулины G к ВПГ, ЦМВ) и неспецифических иммунологических тестов (показатели кластеров клеточной дифференцировки и фагоцитоза) с учетом их корреляции с показателями микрокомпонентного состава биосред указывают на этиопатогенетическую роль ксенобиальных и условно-эссенциальных веществ в модификации противои инфекционного иммунитета.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Бастрон А.С. Особенности состояния иммунной системы по данным комплексного медико-социального иммунологического мониторинга у работников промышленных предприятий Урала и Сибири / А.С. Бастрон, А.В. Зурочка, Е.С. Кремлева // Медицинская иммунология. — 2005. — Т. 7, № 2 — 3. — С. 216 — 217.
2. Долгих В.Т. Основы иммунопатологии / В.Т. Долгих. — М.: Медицинская книга, 2000. — 204 с.
3. Исаков В.А. Герпес: патогенез и лабораторная диагностика: руководство для врачей / В.А. Исаков, В.В. Борисова, Д.В. Исаков. — М., 1999. — 192 с.
4. Черешнев В.А. Физиология иммунной системы и экология / В.А. Черешнев, Н.Н. Кеворков, Б.А. Бахметьев, С.В. Ширшев, Ю.И. Шилов, К.В. Шмагель, В.А. Демаков, М.В. Черешнева,



Dolgikh O.V., Zaitseva N.V., Krivtsov A.V., Zemlyanova M.A., Alexeev V.B., Kiriyarov D.A., Lykhina T.S., Shcherbina S.G., Pustovalova O.V.  
**CHILDREN'S IMMUNITY UNDER CONDITIONS OF XENOGENIC COMPOUNDS' EXPOSURE**

**Abstract.** The article is devoted to the diagnostics of peculiarities of

УДК 618.2/3:61.151.5

Златогорская С.Л.  
**ОСОБЕННОСТИ МЕЖКЛЕТОЧНОЙ КООПЕРАЦИИ ПРИ ТРОМБОФИЛИЧЕСКОМ СИНДРОМЕ У БЕРЕМЕННЫХ**

ММУ Городская клиническая больница № 2 им. Н.А. Семашко, Самара

**Резюме**

Анализ экспрессии молекул адгезии и активационных маркеров на мононуклеарах, профиля провоспалительных цитокинов и уровня активированного протеина С у беременных с приобретенными формами тромбофилического синдрома на фоне хронических воспалительных процессов урогенитального тракта выявил усиление проапоптогенных сигналов, сопровождающееся нарушениями в системе активированного протеина С.

**Актуальность** Хронические процессы сопровождаются дисбалансом в функционировании цитокиновой системы, формирующей и регулирующей весь комплекс защитных реакций как на системном, так и на местном уровнях. Ранее нами было показано, что антифосфолипидный синдром и хроническое диссеминированное внутрисосудистое свертывание у беременных с привычным невынашиванием инфекционного генеза сопровождается различными изменениями в экспрессии активационных маркеров и молекул адгезии на лимфоцитах и цитокинового профиля сыворотки [1]. Дальнейшие исследования в этом направлении позволили установить, что соотношение ИЛ-1Ra/ИЛ-1β в соскобе из цервикального канала позволяет дифференцировать аутоиммунный и инфекционный компоненты при тромбофилическом синдроме у беременных [2]. Хронические воспалительные процессы в стенке кишечника, висцеральные неопластические процессы сопровождаются рецидивирующими тромбозами глубоких вен. Однако, несмотря на высокий процент инвалидности и смертности среди таких пациентов, остается много неясного в понимании механизмов, приводящих к тромбообразованию при разных нозологиях [4, 5].

**Цель исследования:** выявить особенности межклеточного взаимодействия путем комплексной оценки экспрессии молекул адгезии и активационных маркеров на мононуклеарах, профиля провоспалительных цитокинов и уровня активированного протеина С у беременных с приобретенными формами тромбофилического синдрома на фоне хронических воспалительных процессов урогенитального тракта и отсутствии активного ангиогенеза.

**Материалы и методы**

Было проведено определение концентрации CD54+, CD56+, CD11b+, CD95+, HLA-DR+ клеток («Клоноспектр» НПЦ МедБиоСпектр, Москва) методом люминесцентной микроскопии; определение концентрации цитокинов ИЛ-6, ИЛ-8, ФНОα, ИЛ-1Ra, ИЛ-1β в сыворотке крови и соскобе из цервикального канала иммуноферментным методом с использованием тест-систем ООО «Цитокин» (Санкт-Петербург) на роботизированном иммуноферментном анализаторе Chem Well (Awareness Technology, США) в программе «Multipoint» и скрининга комбинированных нарушений в си-

стеме протеина С («Парус-тест», «Фактор-V-PC-тест» Стандарт, Барнаул). В результате клинико-лабораторного наблюдения с синдромом привычной потери плода инфекции в анамнезе в III триместре беременности было проведено дополнительное иммунологическое обследование. Женщины были разделены на следующие группы в зависимости от семейного анамнеза и формы тромбофилического синдрома.

**Key words:** herpetic infection, immune disorders, contamination of biological media.

стеме протеина С («Парус-тест», «Фактор-V-PC-тест» Стандарт, Барнаул).

В результате клинико-лабораторного наблюдения с синдромом привычной потери плода инфекции в анамнезе в III триместре беременности было проведено дополнительное иммунологическое обследование. Женщины были разделены на следующие группы в зависимости от семейного анамнеза и формы тромбофилического синдрома.

I группа — 18 беременных женщин с антифосфолипидным синдромом.

II группа — 22 беременные женщины с хроническим синдромом, сформировавшимся в гестационный период.

III группа (контрольная) — 30 женщин с нормальным течением беременности без осложненного гинекологического анамнеза, проходивших в стационаре скрининг.

Статистическая обработка проводилась методами непараметрической статистики с вычислением средней арифметической и дисперсии (m) и дисперсии (σ). В случае нормального распределения о достоверности различий судили по критерию Манна-Уитни. Если условия нормальности не выполнялись, проводился непараметрический критерий Крускала-Уоллиса. Анализ проводился с применением пакета статистических программ STATISTICA 6.0.

**Результаты**

В результате проведенного исследования было выявлено у беременных с хроническим ДВС-синдромом наиболее значительное усиление экспрессии CD54, индукцию которого влияет увеличение концентрации ФНОα (табл.).

Нами отмечено увеличение концентрации ФНОα у беременных как с АФС (26,09±0,47 пг/мл), синдромом (47,73±9,25 пг/мл по сравнению с 3,66 пг/мл в контрольной группе). Однако концентрация растворимого ИЛ-1Ra была значительно выше в группе с АФС (882,54±22,02 пг/мл по сравнению с 125,27 пг/мл в контрольной группе). У беременных с хроническим синдромом, получающих противотромботическую терапию, выявлено усиление экспрессии маркера CD95, CD11b/CD18 (Mac-1) в периферической крови. У беременных с антифосфолипидным синдромом, находящихся на медикаментозной терапии, выявлено усиление экспрессии CD95, так же как и CD11b/CD18 (Mac-1). Выраженная приобретенная резистентность к тромболитикам в одном случае выявлена не была. Нормализованное значение ФНОα у беременных с АФС составляло 0,81±0,23, при хроническом