

GEORGIAN MEDICAL NEWS

ISSN 1512-0112

No 5 (266) Май 2017

ТБИЛИСИ - NEW YORK



ЕЖЕМЕСЯЧНЫЙ НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ

Медицинские новости Грузии
საქართველოს სამედიცინო სიახლენი

GEORGIAN MEDICAL NEWS

No 5 (266) 2017

Published in cooperation with and under the patronage
of the Tbilisi State Medical University

Издается в сотрудничестве и под патронажем
Тбилисского государственного медицинского университета

გამოიცემა თბილისის სახელმწიფო სამედიცინო უნივერსიტეტთან
თანამშრომლობითა და მისი პატრონაჟით

The present journal issue is devoted to the V European Congress in COPD and Asthma
and the IX Georgian National Congress in Allergy, Asthma and Immunology
Guest Editor – Academician Revaz Sepiashvili

Данный номер журнала посвящается V Европейскому конгрессу по хронической
обструктивной болезни легких и астме и IX Национальному конгрессу аллергии,
астмы и иммунологии

Приглашенный редактор – академик Реваз Сепиашвили

ჟურნალის ეს ნომერი ეძღვნება ასთმის და ფილტვის ქრონიკული
ობსტრუქციული დაავადების ევროპის V კონგრესს და ალერგიის, ასთმისა
და იმუნოლოგიის IX ეროვნულ კონგრესს
მოწვეული რედაქტორი – აკადემიკოსი რევაზ სეფიაშვილი

**ЕЖЕМЕСЯЧНЫЙ НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ
ТБИЛИСИ - НЬЮ-ЙОРК**

GMN: Georgian Medical News is peer-reviewed, published monthly journal committed to promoting the science and art of medicine and the betterment of public health, published by the GMN Editorial Board and The International Academy of Sciences, Education, Industry and Arts (U.S.A.) since 1994. **GMN** carries original scientific articles on medicine, biology and pharmacy, which are of experimental, theoretical and practical character; publishes original research, reviews, commentaries, editorials, essays, medical news, and correspondence in English and Russian.

GMN is indexed in MEDLINE, SCOPUS, PubMed and VINITI Russian Academy of Sciences. The full text content is available through EBSCO databases.

GMN: Медицинские новости Грузии - ежемесячный рецензируемый научный журнал, издаётся Редакционной коллегией и Международной академией наук, образования, искусств и естествознания (IASEIA) США с 1994 года на русском и английском языках в целях поддержки медицинской науки и улучшения здравоохранения. В журнале публикуются оригинальные научные статьи в области медицины, биологии и фармации, статьи обзорного характера, рецензии, научные сообщения, новости медицины и здравоохранения.

Журнал индексируется в MEDLINE, отражён в базе данных SCOPUS, PubMed и ВИНТИ РАН. Полнотекстовые статьи журнала доступны через БД EBSCO.

GMN: Georgian Medical News – საქართველოს სამედიცინო სიახლენი – არის ყოველთვიური სამეცნიერო სამედიცინო რეცენზირებადი ჟურნალი, გამოიცემა 1994 წლიდან, წარმოადგენს სარედაქციო კოლეგიისა და აშშ-ის მეცნიერების, განათლების, ინდუსტრიის, ხელოვნებისა და ბუნებისმეტყველების საერთაშორისო აკადემიის ერთობლივ გამოცემას. GMN-ში რუსულ და ინგლისურ ენებზე ქვეყნდება ექსპერიმენტული, თეორიული და პრაქტიკული ხასიათის ორიგინალური სამეცნიერო სტატიები მედიცინის, ბიოლოგიისა და ფარმაციის სფეროში, მიმოხილვითი ხასიათის სტატიები, რეცენზიები.

ჟურნალი ინდექსირებულია MEDLINE-ის საერთაშორისო სისტემაში, ასახულია SCOPUS-ის, PubMed-ის და ВИНТИ РАН-ის მონაცემთა ბაზებში. სტატიების სრული ტექსტი ხელმისაწვდომია EBSCO-ს მონაცემთა ბაზებშიდან.

МЕДИЦИНСКИЕ НОВОСТИ ГРУЗИИ

Ежемесячный совместный грузино-американский научный электронно-печатный журнал
Агентства медицинской информации Ассоциации деловой прессы Грузии,
Академии медицинских наук Грузии, Международной академии наук, индустрии,
образования и искусств США.
Издается с 1994 г., распространяется в СНГ, ЕС и США

НАУЧНЫЙ РЕДАКТОР

Лаури Манагадзе

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР

Нино Микаберидзе

НАУЧНО-РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

Зураб Вадачкориа - председатель Научно-редакционного совета

Михаил Бахмутский (США), Александр Геннинг (Германия), Амиран Гамкрелидзе (Грузия),
Константин Кипиани (Грузия), Георгий Кавтарадзе (Грузия), Георгий Камкамидзе (Грузия),
Паата Куртанидзе (Грузия), Вахтанг Масхулия (Грузия), Тамара Микаберидзе (Грузия),
Тенгиз Ризнис (США), Реваз Сепиашвили (Грузия), Дэвид Элуа (США)

НАУЧНО-РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Лаури Манагадзе - председатель Научно-редакционной коллегии

Архимандрит Адам - Вахтанг Ахаладзе, Амиран Антадзе, Нелли Антелава,
Рима Бериашвили, Лео Бокерия, Отар Герзмава, Лиана Гогиашвили, Нодар Гогебашвили,
Николай Гонгадзе, Манана Жвания, Ирина Квачадзе, Нана Квирквелия, Зураб Кеванишвили,
Гурам Кикнадзе, Палико Кинтраиа, Теймураз Лежава, Джанлуиджи Мелотти, Караман Пагава,
Николай Пирцхалаишвили, Мамука Пирцхалаишвили, Фридон Тодуа,
Кеннет Уолкер, Рамаз Хецуриани, Рудольф Хохенфеллнер, Кахабер Челидзе,
Тинатин Чиковани, Арчил Чхотуа, Рамаз Шенгелия

Website:

www.geomednews.org

The International Academy of Sciences, Education, Industry & Arts. P.O.Box 390177,
Mountain View, CA, 94039-0177, USA. Tel/Fax: (650) 967-4733

Версия: печатная. **Цена:** свободная.

Условия подписки: подписка принимается на 6 и 12 месяцев.

По вопросам подписки обращаться по тел.: 293 66 78.

Контактный адрес: Грузия, 0177, Тбилиси, ул. Асатиани 7, III этаж, комната 313
тел.: 995(32) 254 24 91, 995(32) 222 54 18, 995(32) 253 70 58

Fax: +995(32) 253 70 58, e-mail: ninomikaber@hotmail.com; nikopir@dgmholding.com

По вопросам размещения рекламы обращаться по тел.: 5(99) 97 95 93

© 2001. Ассоциация деловой прессы Грузии

© 2001. The International Academy of Sciences,
Education, Industry & Arts (USA)

GEORGIAN MEDICAL NEWS

Monthly Georgia-US joint scientific journal published both in electronic and paper formats of the Agency of Medical Information of the Georgian Association of Business Press; Georgian Academy of Medical Sciences; International Academy of Sciences, Education, Industry and Arts (USA).

Published since 1994. Distributed in NIS, EU and USA.

SCIENTIFIC EDITOR

Lauri Managadze

EDITOR IN CHIEF

Nino Mikaberidze

SCIENTIFIC EDITORIAL COUNCIL

Zurab Vadachkoria - Head of Editorial council

Michael Bakhmutsky (USA), Alexander Gënning (Germany), Amiran Gamkrelidze (Georgia), David Elua (USA), Konstantin Kipiani (Georgia), Giorgi Kavtaradze (Georgia), Giorgi Kamkamidze (Georgia), Paata Kurtanidze (Georgia), Vakhtang Maskhulia (Georgia), Tamara Mikaberidze (Georgia), Tengiz Riznis (USA), Revaz Sepiashvili (Georgia)

SCIENTIFIC EDITORIAL BOARD

Lauri Managadze - Head of Editorial board

Archimandrite Adam - Vakhtang Akhaladze, Amiran Antadze, Nelly Antelava, Rima Beriashvili, Leo Bokeria, Kakhaber Chelidze, Tinatin Chikovani, Archil Chkhotua, Otar Gerzmava, Liana Gogiashvili, Nodar Gogebashvili, Nicholas Gongadze, Rudolf Hohenfellner, Zurab Kevanishvili, Ramaz Khetsuriani, Guram Kiknadze, Paliko Kintraia, Irina Kvachadze, Nana Kvirkvelia, Teymuraz Lezhava, Gianluigi Melotti, Kharaman Pagava, Nicholas Pirtskhalaishvili, Mamuka Pirtskhalaishvili, Ramaz Shengelia, Pridon Todua, Kenneth Walker, Manana Zhvania

CONTACT ADDRESS IN TBILISI

GMN Editorial Board
7 Asatiani Street, 3th Floor
Tbilisi, Georgia 0177

Phone: 995 (32) 254-24-91
995 (32) 222-54-18
995 (32) 253-70-58
Fax: 995 (32) 253-70-58

CONTACT ADDRESS IN NEW YORK

NINITEX INTERNATIONAL, INC.
3 PINE DRIVE SOUTH
ROSLYN, NY 11576 U.S.A.

Phone: +1 (917) 327-7732

WEBSITE

www.geomednews.org

К СВЕДЕНИЮ АВТОРОВ!

При направлении статьи в редакцию необходимо соблюдать следующие правила:

1. Статья должна быть представлена в двух экземплярах, на русском или английском языках, напечатанная через **полтора интервала на одной стороне стандартного листа с шириной левого поля в три сантиметра**. Используемый компьютерный шрифт для текста на русском и английском языках - **Times New Roman (Кириллица)**, для текста на грузинском языке следует использовать **AcadNusx**. Размер шрифта - **12**. К рукописи, напечатанной на компьютере, должен быть приложен CD со статьей.

2. Размер статьи должен быть не менее десяти и не более двадцати страниц машинописи, включая указатель литературы и резюме на английском, русском и грузинском языках.

3. В статье должны быть освещены актуальность данного материала, методы и результаты исследования и их обсуждение.

При представлении в печать научных экспериментальных работ авторы должны указывать вид и количество экспериментальных животных, применявшиеся методы обезболивания и усыпления (в ходе острых опытов).

4. К статье должны быть приложены краткое (на полстраницы) резюме на английском, русском и грузинском языках (включающее следующие разделы: цель исследования, материал и методы, результаты и заключение) и список ключевых слов (key words).

5. Таблицы необходимо представлять в печатной форме. Фотокопии не принимаются. **Все цифровые, итоговые и процентные данные в таблицах должны соответствовать таковым в тексте статьи**. Таблицы и графики должны быть озаглавлены.

6. Фотографии должны быть контрастными, фотокопии с рентгенограмм - в позитивном изображении. Рисунки, чертежи и диаграммы следует озаглавить, пронумеровать и вставить в соответствующее место текста **в tiff формате**.

В подписях к микрофотографиям следует указывать степень увеличения через окуляр или объектив и метод окраски или импрегнации срезов.

7. Фамилии отечественных авторов приводятся в оригинальной транскрипции.

8. При оформлении и направлении статей в журнал МНГ просим авторов соблюдать правила, изложенные в «Единых требованиях к рукописям, представляемым в биомедицинские журналы», принятых Международным комитетом редакторов медицинских журналов - <http://www.spinesurgery.ru/files/publish.pdf> и http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html В конце каждой оригинальной статьи приводится библиографический список. В список литературы включаются все материалы, на которые имеются ссылки в тексте. Список составляется в алфавитном порядке и нумеруется. Библиографическое описание литературы составляется на языке текста документа. В списке литературы сначала приводятся работы, написанные знаками грузинского алфавита, затем кириллицей и латиницей. Ссылки на цитируемые работы в тексте статьи даются в квадратных скобках в виде номера, соответствующему номеру данной работы в списке литературы.

9. Для получения права на публикацию статья должна иметь от руководителя работы или учреждения визу и сопроводительное отношение, написанные или напечатанные на бланке и заверенные подписью и печатью.

10. В конце статьи должны быть подписи всех авторов, полностью приведены их фамилии, имена и отчества, указаны служебный и домашний номера телефонов и адреса или иные координаты. Количество авторов (соавторов) не должно превышать пяти человек.

11. Редакция оставляет за собой право сокращать и исправлять статьи. Корректурa авторам не высылается, вся работа и сверка проводится по авторскому оригиналу.

12. Недопустимо направление в редакцию работ, представленных к печати в иных издательствах или опубликованных в других изданиях.

При нарушении указанных правил статьи не рассматриваются.

REQUIREMENTS

Please note, materials submitted to the Editorial Office Staff are supposed to meet the following requirements:

1. Articles must be provided with a double copy, in English or Russian languages and typed or computer-printed on a single side of standard typing paper, with the left margin of **3** centimeters width, and **1.5** spacing between the lines, typeface - **Times New Roman (Cyrillic)**, print size - **12** (referring to Georgian and Russian materials). With computer-printed texts please enclose a CD carrying the same file titled with Latin symbols.

2. Size of the article, including index and resume in English, Russian and Georgian languages must be at least 10 pages and not exceed the limit of 20 pages of typed or computer-printed text.

3. Submitted material must include a coverage of a topical subject, research methods, results, and review.

Authors of the scientific-research works must indicate the number of experimental biological species drawn in, list the employed methods of anesthetization and soporific means used during acute tests.

4. Articles must have a short (half page) abstract in English, Russian and Georgian (including the following sections: aim of study, material and methods, results and conclusions) and a list of key words.

5. Tables must be presented in an original typed or computer-printed form, instead of a photocopied version. **Numbers, totals, percentile data on the tables must coincide with those in the texts of the articles.** Tables and graphs must be headed.

6. Photographs are required to be contrasted and must be submitted with doubles. Please number each photograph with a pencil on its back, indicate author's name, title of the article (short version), and mark out its top and bottom parts. Drawings must be accurate, drafts and diagrams drawn in Indian ink (or black ink). Photocopies of the X-ray photographs must be presented in a positive image in **tiff format**.

Accurately numbered subtitles for each illustration must be listed on a separate sheet of paper. In the subtitles for the microphotographs please indicate the ocular and objective lens magnification power, method of coloring or impregnation of the microscopic sections (preparations).

7. Please indicate last names, first and middle initials of the native authors, present names and initials of the foreign authors in the transcription of the original language, enclose in parenthesis corresponding number under which the author is listed in the reference materials.

8. Please follow guidance offered to authors by The International Committee of Medical Journal Editors guidance in its Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals publication available online at: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html
http://www.icmje.org/urm_full.pdf

In GMN style for each work cited in the text, a bibliographic reference is given, and this is located at the end of the article under the title "References". All references cited in the text must be listed. The list of references should be arranged alphabetically and then numbered. References are numbered in the text [numbers in square brackets] and in the reference list and numbers are repeated throughout the text as needed. The bibliographic description is given in the language of publication (citations in Georgian script are followed by Cyrillic and Latin).

9. To obtain the rights of publication articles must be accompanied by a visa from the project instructor or the establishment, where the work has been performed, and a reference letter, both written or typed on a special signed form, certified by a stamp or a seal.

10. Articles must be signed by all of the authors at the end, and they must be provided with a list of full names, office and home phone numbers and addresses or other non-office locations where the authors could be reached. The number of the authors (co-authors) must not exceed the limit of 5 people.

11. Editorial Staff reserves the rights to cut down in size and correct the articles. Proof-sheets are not sent out to the authors. The entire editorial and collation work is performed according to the author's original text.

12. Sending in the works that have already been assigned to the press by other Editorial Staffs or have been printed by other publishers is not permissible.

**Articles that Fail to Meet the Aforementioned
Requirements are not Assigned to be Reviewed.**

ავტორთა საქურაღებოლ!

რედაქციაში სტატიის წარმოდგენისას საჭიროა დაიცვათ შემდეგი წესები:

1. სტატია უნდა წარმოადგინოთ 2 ცალად, რუსულ ან ინგლისურ ენებზე დაბეჭდილი სტანდარტული ფურცლის 1 გვერდზე, 3 სმ სიგანის მარცხენა ველისა და სტრიქონებს შორის 1,5 ინტერვალის დაცვით. გამოყენებული კომპიუტერული შრიფტი რუსულ და ინგლისურენოვან ტექსტებში - **Times New Roman (Кириллица)**, ხოლო ქართულენოვან ტექსტში საჭიროა გამოვიყენოთ **AcadNusx**. შრიფტის ზომა – 12. სტატიას თან უნდა ახლდეს CD სტატიით.

2. სტატიის მოცულობა არ უნდა შეადგენდეს 10 გვერდზე ნაკლებს და 20 გვერდზე მეტს ლიტერატურის სიის და რეზიუმეების (ინგლისურ, რუსულ და ქართულ ენებზე) ჩათვლით.

3. სტატიაში საჭიროა გაშუქდეს: საკითხის აქტუალობა; კვლევის მიზანი; საკვლევი მასალა და გამოყენებული მეთოდები; მიღებული შედეგები და მათი განსჯა. ექსპერიმენტული ხასიათის სტატიების წარმოდგენისას ავტორებმა უნდა მიუთითონ საექსპერიმენტო ცხოველების სახეობა და რაოდენობა; გაუტკივარებისა და დაძინების მეთოდები (მწვავე ცდების პირობებში).

4. სტატიას თან უნდა ახლდეს რეზიუმე ინგლისურ, რუსულ და ქართულ ენებზე არანაკლებ ნახევარი გვერდის მოცულობისა (სათაურის, ავტორების, დაწესებულების მითითებით და უნდა შეიცავდეს შემდეგ განყოფილებებს: მიზანი, მასალა და მეთოდები, შედეგები და დასკვნები; ტექსტუალური ნაწილი არ უნდა იყოს 15 სტრიქონზე ნაკლები) და საკვანძო სიტყვების ჩამონათვალი (key words).

5. ცხრილები საჭიროა წარმოადგინოთ ნაბეჭდი სახით. ყველა ციფრული, შემაჯამებელი და პროცენტული მონაცემები უნდა შეესაბამებოდეს ტექსტში მოყვანილს.

6. ფოტოსურათები უნდა იყოს კონტრასტული; სურათები, ნახაზები, დიაგრამები - დასათაურებული, დანომრილი და სათანადო ადგილას ჩასმული. რენტგენოგრაფიების ფოტოასლები წარმოადგინეთ პოზიტიური გამოსახულებით **tiff** ფორმატში. მიკროფოტოსურათების წარწერებში საჭიროა მიუთითოთ ოკულარის ან ობიექტივის საშუალებით გადიდების ხარისხი, ანათალებების შედეგების ან იმპრეგნაციის მეთოდი და აღნიშნოთ სურათის ზედა და ქვედა ნაწილები.

7. სამამულო ავტორების გვარები სტატიაში აღინიშნება ინიციალების თანდართვით, უცხოურისა – უცხოური ტრანსკრიპციით.

8. სტატიას თან უნდა ახლდეს ავტორის მიერ გამოყენებული სამამულო და უცხოური შრომების ბიბლიოგრაფიული სია (ბოლო 5-8 წლის სიღრმით). ანბანური წყობით წარმოდგენილ ბიბლიოგრაფიულ სიაში მიუთითეთ ჯერ სამამულო, შემდეგ უცხოელი ავტორები (გვარი, ინიციალები, სტატიის სათაური, ჟურნალის დასახელება, გამოცემის ადგილი, წელი, ჟურნალის №, პირველი და ბოლო გვერდები). მონოგრაფიის შემთხვევაში მიუთითეთ გამოცემის წელი, ადგილი და გვერდების საერთო რაოდენობა. ტექსტში კვადრატულ ფხიხლებში უნდა მიუთითოთ ავტორის შესაბამისი N ლიტერატურის სიის მიხედვით.

9. სტატიას თან უნდა ახლდეს: ა) დაწესებულების ან სამეცნიერო ხელმძღვანელის წარდგინება, დამოწმებული ხელმოწერითა და ბეჭდით; ბ) დარგის სპეციალისტის დამოწმებული რეცენზია, რომელშიც მითითებული იქნება საკითხის აქტუალობა, მასალის საკმაობა, მეთოდის სანდოობა, შედეგების სამეცნიერო-პრაქტიკული მნიშვნელობა.

10. სტატიის ბოლოს საჭიროა ყველა ავტორის ხელმოწერა, რომელთა რაოდენობა არ უნდა აღემატებოდეს 5-ს.

11. რედაქცია იტოვებს უფლებას შეასწოროს სტატია. ტექსტზე მუშაობა და შეჯერება ხდება საავტორო ორიგინალის მიხედვით.

12. დაუშვებელია რედაქციაში ისეთი სტატიის წარდგენა, რომელიც დასაბეჭდად წარდგენილი იყო სხვა რედაქციაში ან გამოქვეყნებული იყო სხვა გამოცემებში.

აღნიშნული წესების დარღვევის შემთხვევაში სტატიები არ განიხილება.

Содержание:

Сепиашвили Р.И. ИММУНОРЕАБИЛИТОЛОГИЯ: ВЗГЛЯД ОТ ИСТОКОВ В БУДУЩЕЕ. ОТ ИММУНОТЕРАПИИ К ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННОЙ ТАРГЕТНОЙ ИММУНОРЕАБИЛИТАЦИИ.....	7
Славянская Т.А., Сальникова С.В. ОСНОВНЫЕ ЭТАПЫ ПРИГОТОВЛЕНИЯ ЖИЗНЕСПОСОБНЫХ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК РАКА МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ: ОТ ВЫДЕЛЕНИЯ ОПУХОЛЕВОГО МАТЕРИАЛА ДО КРИОКОНСЕРВАЦИИ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ	19
Славянская Т.А., Сальникова С.В., Сепиашвили Р.И. КРИТЕРИИ ОТБОРА ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК И ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ИММУНОТЕРАПИИ ПРИ РАКЕ МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ	26
Paksashvili N., Ninikashvili T., Azrumelashvili T., Mizandari M. CURATIVE TREATMENT OF COLORECTAL CANCER SOLITARY METASTASIS TO LIVER SUBCAPSULE BY PERCUTANEOUS US GUIDED RADIOFREQUENCY ABLATION USING HYDRODISSECTION (CASE REPORT).....	34
Mitskevich N., Tsertsvadze T., Mchedlishvili K., Matchavariani K., Guruli G. MODULATION OF ANTITUMOR IMMUNE RESPONSE IN MOUSE PROSTATE CANCER MODEL.....	39
Быков М.И., Сепиашвили Р.И., Щава В.В., Гобаева С.Л., Быков И.М., Басов А.А. ВЫБОР СПОСОБА МИНИИНВАЗИВНОЙ ПАЛЛИАТИВНОЙ ДЕКОМПРЕССИИ ПРИ ЛЕЧЕНИИ БОЛЬНЫХ СО ЗЛОКАЧЕСТВЕННОЙ ОБСТРУКЦИЕЙ ЖЕЛЧЕВЫВОДЯЩИХ ПУТЕЙ НА ОСНОВЕ ИЗУЧЕНИЯ БИОХИМИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ЖЕЛЧИ	47
Pantsulaia I., Kikodze N., Chikovani T. LATENT TUBERCULOSIS POTENTIAL BIOMARKERS: REACTIVATION OF INFECTION.....	54
Аристанбекова М.С., Балмасова И.П., Малова Е.С., Сепиашвили Р.И. АНТИРЕТРОВИРУСНАЯ ТЕРАПИЯ И РИСК ПРОГРЕССИРОВАНИЯ ФИБРОЗА ПЕЧЕНИ У БОЛЬНЫХ, КОИНФИЦИРОВАННЫХ ВИЧ/ВГС	58
Нестерова И.В., Ковалева С.В., Чудилова Г.А., Ломтатидзе Л.В., Крутова В.А., Асланян И.Э., Тулендинова А.И., Малиновская В.В. КОМБИНИРОВАННАЯ ИММУНОТЕРАПИЯ РЕЦИДИВИРУЮЩЕГО ХРОНИЧЕСКОГО НЕСПЕЦИФИЧЕСКОГО ВУЛЬВОВАГИНИТА У ИММУНОКОМПРОМЕТИРОВАННЫХ ДЕВОЧЕК.....	64
Kobaidze K., Harrison A., Burklin Y., Patidar V., Riccardi M. AUTOIMMUNE LIMBIC ENCEPHALITIS (CASE REPORTS)	69
Кикалишвили Б.Ю., Горгаслидзе Н.С., Зурабашвили Д.З., Сулаквелидзе Ц.П., Малания М.А., Турабелидзе Д.Г. ИССЛЕДОВАНИЕ ЛИПИДОВ ПЛОДОВ МЕЛКОГО ОРЕХА (CORYLUS AVELLANA L), ПРОИЗРАСТАЮЩЕГО В ГРУЗИИ	74
Беридзе Д.Н., Мегревели М.В., Джохадзе М.С., Бакуридзе К.А., Берашвили Д.Т., Бакуридзе А.Д. ИССЛЕДОВАНИЕ ЦИТОТОКСИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ МЕТАНОЛЬНЫХ ЭКСТРАКТОВ ЭНДЕМИЧНЫХ ВИДОВ РАСТЕНИЙ РОДА ERYSIMUM АДЖАРСКОГО ФЛОРИСТИЧЕСКОГО РАЙОНА ГРУЗИИ	80

Sepiashvili R., Chikhladze M., Khachapuridze D., Gamkrelidze S. CORRELATION BETWEEN SPIROMETRY DATES AND SPECIAL ALLERGEN- SPECIFIC IgE IN PATIENTS WITH BRONCHIAL ASTHMA IN WEST GEORGIA.....	86
Валишвили Т.Н., Чихладзе М.В., Гамкrelидзе С.Л. ОЦЕНКА ПАРАМЕТРОВ ВНЕШНЕГО ДЫХАНИЯ СТУДЕНТОВ.....	89
Мачарадзе Д.Ш., Янаева Х.А., Авиллов К.К. АМБРОЗИЙНАЯ АЛЛЕРГИЯ НА ЮГЕ РОССИИ - В ЧЕЧЕНСКОЙ РЕСПУБЛИКЕ.....	93
Халтурина Е.О., Нестерова И.В. ОЦЕНКА ДИНАМИКИ ДЛИНЫ ТЕЛОМЕР ЛИМФОЦИТОВ У ИММУНОКОМПРОМЕТИРОВАННЫХ ДЕТЕЙ С ХРОНИЧЕСКИМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ РЕСПИРАТОРНОГО ТРАКТА.....	99
Иванов М.Ф., Балмасова И.П., Васнёва Ж.П. ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ЛИМФОЦИТОВ ПРИ ГЕМОРАГИЧЕСКОЙ ЛИХОРАДКЕ С ПОЧЕЧНЫМ СИНДРОМОМ	104
Нестерова И.В., Евглевский А.А., Чудилова Г.А., Ковалева С.В., Ломтатидзе Л.В. ДИНАМИКА ВОЗНИКНОВЕНИЯ И РЕГРЕССИИ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ЭКСТРАЦЕЛЛЮЛЯРНЫХ СЕТЕЙ В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ РАНЕВОГО ИНФЕКЦИОННО-ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ПРОЦЕССА	110

НАУКА

**ИММУНОРЕАБИЛИТОЛОГИЯ: ВЗГЛЯД ОТ ИСТОКОВ В БУДУЩЕЕ.
ОТ ИММУНОТЕРАПИИ К ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННОЙ
ТАРГЕТНОЙ ИММУНОРЕАБИЛИТАЦИИ**

Сепиашвили Р.И.

Российский университет дружбы народов, Москва; Национальный Институт аллергологии, астмы и клинической иммунологии АН Грузии; Институт иммунофизиологии, Москва, Российская Федерация

Успехи, достигнутые в клинической иммунологии за последние годы, позволили к настоящему времени выявить нарушения функционирования иммунной системы при различных состояниях организма. Однако не всегда применяемые средства и методы их лечения обладали достаточным терапевтическим эффектом и давали желаемые результаты. Для восстановления нарушенной функции иммунной системы необходимы иные подходы к принципам лечения. Толчком к накоплению нового уровня знаний и катализатором научных исследований в клинической иммунологии послужило внедрение нового понятия – иммунореабилитация [7,8]. В его смысл по современным представлениям вкладывается не только восстановление нарушенных звеньев иммунной системы, но и выздоровление больного при остром течении заболевания или достижение стойкой ремиссии при хронической патологии [1,3-6,10-22].

Мне посчастливилось быть у истоков ее зарождения и стать не только основоположником совершенно нового научного направления – иммунореабилитации, но и основателем новой медицинской науки – иммунореабилитологии.

Сегодня можно уверенно сказать, что иммунореабилитология прошла путь от простого термина, от «восточной сказки» до всемирного признания. Многие мои ученики, последователи в различных странах и регионах мира активно включились в разработку и изучение проблем, основных методов и принципов иммунореабилитологии. Выпускаются монографии, статьи, публикуются обзоры, защищаются диссертации, проводятся научные конгрессы, конференции, симпозиумы, т.е. иммунореабилитология как наука живет полноценной жизнью. Хотелось бы оглянуться назад и вспомнить путь, который прошла медицинская наука, прежде чем прийти к пониманию иммунореабилитологии, а также рассказать читателям о современных ее успехах и перспективах ее развития.

Исторически сложилось так, что термин иммунореабилитация возник на фоне уже имеющихся определенных успехов лечения больных с нарушенной функцией иммунной системы. Вначале возникло понятие им-

мунотерапии, когда лечение той или иной патологии проводили иммунологическими методами. Например, применение при дифтерии противодифтерийного анатоксина.

Затем встала проблема пересадки органов и тканей при аутоиммунных заболеваниях. Необходимо было затормозить нормальное функционирование иммунной системы. И понятие иммуносупрессия точно охарактеризовало поставленную цель.

Появление вторичных иммунодефицитов, связанных с иммунологической недостаточностью, поставило вопрос об иммуностимуляции, понятия многозначного вначале, но как только было установлено, что иммунная система функционирует с помощью по крайней мере двух десятков различных звеньев, то сразу встал вопрос: какое звено стимулировать? А то простимулируешь клетки-супрессоры – и вместо ожидаемого эффекта улучшения можно ухудшить состояние больного. Поэтому понятие «иммуностимуляция» не объясняло, что стимулировать, а что тормозить, а также не могло дать основание для дифференцированного подхода к каждому звену.

Внедрение в практику иммунокоррекции на этом фоне было объективным процессом, с помощью которого можно осуществить коррекцию нарушенных показателей иммунной системы и вывести их на некий новый уровень, который соответствует нормальным параметрам.

Однако часто возникал вопрос: всегда ли необходимо применение иммунокоррекции? Если снижен какой-то показатель, то следует ли его приводить к норме? В связи с этим понятие «иммунокоррекция» не всегда давало ответы на возникающие вопросы. Поэтому появление понятия иммуномодуляции в середине 70-х годов XX века было объективным процессом в клинической иммунологии, а применение иммуномодулирующих препаратов при этом оказывало иммунотропное действие с эффектом восстановления пониженных или повышенных показателей иммунной системы до нормы.

В многочисленных работах показано стимулирующее и супрессорное влияние на иммунную систему различ-

ных факторов экзогенного и эндогенного характера. К ним относятся разнообразные вещества органической и неорганической природы, биополимеры, компоненты чужеродных органов и тканей, микробных клеток. При этом все вещества, благоприятно влияющие на иммунитет, получили название «адьюванты» (от англ. *adjuvant* – помогающий, полезный).

В ряде работ понятие иммуномодуляторов толкуется очень широко: к ним относят адьюванты, иммунодепрессанты. Приняв такую точку зрения, мы должны были бы констатировать, что все зарегистрированные иммунобиологические препараты (а их более тысячи) – вакцины, иммуноглобулины, бактериофаги, препараты нормофлоры, аллергены, цитокины – являются иммуномодулирующими препаратами. Ежегодно только в России 20–30 новых иммунобиологических препаратов успешно проходят государственные испытания, причем 1/3 из них – это препараты, вводимые людям [12]. Такая широкая трактовка была бы вполне справедливой, если бы иммунный ответ не был специфической реакцией на антиген.

Для понимания, что же такое иммуномодуляторы, нами дано их определение:

Имуномодуляторы – это препараты, преимущественно влияющие в той или иной степени на функциональную систему иммунного гомеостаза и характеризующиеся тропностью и специфичностью к иммунной системе.

С различной степенью интенсивности на иммунную систему могут влиять и другие, самые различные препараты и воздействия, например, пищевые добавки, различного рода цитостатики и ионизирующее излучение. Однако такие модуляторы не обладают тропностью к системе иммунитета и преимущественным действием на ее параметры и в относительно равной степени действуют на различные организменные системы, в том числе и на иммунную. Поэтому они не могут относиться к обозначенной выше категории иммуномодуляторов и именуется как препараты, неспецифически влияющие на иммунную систему, способные оказывать депрессивное или, наоборот, стимулирующее действие на ее количественные и/или функциональные параметры.

Исходя из приведенного выше определения, к иммуномодуляторам можно отнести уже не тысячи, а только десятки веществ, и притом только те, которые официально зарегистрированы в соответствующих государственных органах как иммуномодулирующие препараты.

Если принять этот постулат за основу, то большинство адьювантов и иммунодепрессантов не могут быть классифицированы как иммуномодуляторы. И тогда по праву можно считать, что сама иммуномодуляция

реально возникла не в начале XX века, а скорее всего, когда в 1972 г. американский ученый Allan Goldstein впервые выделил из тимуса телят несколько полипептидов, которые различались по молекулярной массе и степени активности, и назвал их тимозинами. Особое внимание привлекла пятая фракция, выделенная посредством изоэлектрической фокусировки и содержащая 40–50 белков. В соответствии с изоэлектрической точкой они получили названия: α (изоэлектрическая точка <5,0); β (от 5,0 до 7,0); γ (>7,0).

Совершенно логично, что на определенном этапе развития науки, в середине 80-годов XX века, появилось новое направление современной медицины – иммунореабилитация, учитывающее взаимосвязь между иммунной и другими системами организма (нервной, эндокринной, дыхательной, кровообращения). В это понятие вкладывалось не только восстановление нарушенных звеньев иммунной системы, но и выздоровление больного при остром течении заболевания или достижение стойкой ремиссии при хронической патологии. Понятие иммунореабилитации включает реконструктивное, медикаментозное, физиотерапевтическое, санаторно-курортное восстановление способности иммунной системы осуществлять защитные и регуляторные функции [7,8,11,17,19]. Первые исследования проблемы иммунореабилитации при некоторых заболеваниях внутренних органов в клинике, аутоиммунной патологии и вторичных иммунодефицитах [1–19] показали большую эффективность ее принципов.

А началось все это в 1984 году, когда судьба распорядилась так, что я был вынужден переехать работать из Краснодара в Цхалтубо, где нами был организован общекурортный иммунологический центр, а в 1989 году создан Цхалтубский научно-исследовательский институт клинической иммунологии и аллергологии, который за время существования стал признанным в мире лидером в разработке и научном обосновании основных принципов и методов иммунореабилитации как в клинических, так и санаторно-курортных условиях, определяющих назначение тех или иных лекарственных препаратов, курортных и преформированных физических факторов при патологии иммунной системы. Кроме того, в Институте были разработаны показания и противопоказания к их применению в зависимости от возраста и стадии заболевания, разработаны клинические и лабораторные, в том числе иммунологические тесты оценки действия изучаемых естественных факторов, возможность их сочетанного применения, установлены оптимальные условия для их назначения (разовые и курсовые дозы, способы применения, совместимость между собой, с лекарственными иммуномодуляторами и другими медикаментозными средствами, выявление осложнений), разработаны превентивные и противорецидивные меры. Установлена взаимосвязь клинического течения болезни с со-

стоянием иммунологической реактивности организма. У пациентов с достаточно стойкой ремиссией (6-12 месяцев), как правило, определялись нормальные, близкие к норме или незначительные изменения иммунологических параметров. В противоположность этому, относительные ранние рецидивы болезни (1-2 месяца) выявлялись преимущественно у лиц с наиболее стойкими и долговременными нарушениями функции иммунной системы. Показана возможность сочетания санаторно-курортных факторов иммунореабилитации с лекарственными иммуномодуляторами. Впервые применен способ введения в организм иммуномодулирующих препаратов с использованием физиотерапевтических процедур (электрофорез, фонофорез). Показана высокая эффективность и безвредность указанного метода.

Для реабилитации больных с нарушенной функцией иммунной системы нами впервые был предложен и внедрен в практику принцип этапности – «клиника института - санаторий (иммунореабилитационный центр)». При этом оценка иммунной системы осуществлялась по единым методикам на всех этапах. Показано преимущество данного принципа лечения перед традиционными методами.

Учет клинко-иммунологической характеристики больных с нарушенной функцией иммунной системы является обязательным базисом для выбора дальнейшей реабилитационной практики. Методы иммунореабилитации безвредны, не обладают побочными действиями, не вызывают осложнений, легко доступны для применения не только у лиц в молодом возрасте или средних лет, но и у пожилых людей, для которых применение некоторых медикаментозных средств или методов лечения противопоказано и чревато различными осложнениями.

Результаты проведенных исследований показали, что иммунореабилитация является необходимым этапом терапии пациентов с нарушенной функцией иммунной системы, обладает большой эффективностью, что выражается в торможении прогрессирования патологического процесса, сокращении сроков лечения основного заболевания, уменьшения числа рецидивов, значительном удлинении ремиссии или полном восстановлении здоровья и трудоспособности больных.

Полученные данные явились базисом нового направления – иммунореабилитации – сложного, многогранного процесса, включающего не только медицинские, но и профессиональные, психологические аспекты и имеющего при различных патологических процессах свои особенности и закономерности, которые составляют основу новой области знаний медицинской науки в общем и иммунологии, в частности.

Но для осуществления этого процесса необходимо осознать, что же подразумевается под иммунореабилитацией, чем она отличается от иммунокоррекции, каковы ее принципы? Необходимо ответить и на ряд других вопросов. Отправной точкой стало понятие самой концепции реабилитации (восстановление прав). Но даже в этом вопросе есть свои сложности. В некоторых странах в последние годы пользуются «принципом нормализации» (“principle of normalization”) близким к термину «абилитация» (“habilitation”) – предоставление прав, применяемое часто в отношении лиц, страдающих с раннего возраста каким-либо физическим или психическим дефектом. Во Франции и франкоязычных странах предпочитают говорить о «реадаптации» (“readaptation”), вкладывая в этот термин несколько иное содержание – восстановление приспособляемости (чаще всего имеется в виду восстановление приспособляемости на измененном болезнью уровне). Термин «адаптация» многие авторы предлагают сохранить лишь для биологической приспособляемости. Длительная активация иммунной системы является одним из патогенетических факторов срыва адаптационных механизмов, что обуславливает хронизацию воспалительного процесса.

При этом иммунная система становится лабильной к воздействию указанных факторов, что проявляется в виде количественных и качественных изменений в составе основных компонентов иммунитета, нарушений иммунорегуляторных механизмов, осуществляющих созревание, дифференцировку и межклеточные взаимодействия. Глубинные механизмы нарушения нормального физиологического функционирования и взаимодействия иммунокомпетентных клеток в иммунном ответе, выражающиеся как в нарушении экспрессии мембранно-рецепторного аппарата, так и в изменении цитокинового профиля в процессе развития заболевания, сами зачастую становятся основной патогенетической причиной возникновения «порочного круга», приводящего к «самоподдержанию» иммунопатологии и перехода в хроническое течение болезни, особенностью которой является протекание ее в более тяжелых, затяжных и рецидивирующих формах. Нежелательные последствия превращаются в широкий спектр патологии в виде аллергических, аутоиммунных, воспалительных и онкологических заболеваний.

В ряде стран Западной Европы и США реабилитацию рассматривают как «третичную профилактику», цель которой заключается в избегании инвалидности или уменьшении ее последствий. Нередко приходится слышать о том, что концепция реабилитации включает в себя «всё и вся», т.е. профилактику, лечение, последующее после болезни приспособление к жизни и труду. Таким образом, как бы стираются грани, различия между этими понятиями, что верно лишь отчасти.

Реабилитация - это не только профилактика, лечение и трудоустройство, это, прежде всего, новый подход к больному человеку.

Не обсуждая преимуществ и недостатков всех этих понятий, скажем только, что термин «реабилитация» получил в настоящее время международное признание и его распространение поддержала ВОЗ, по определению которой «реабилитация – это комбинированное и координированное применение медицинских, социальных, педагогических и профессиональных мероприятий с целью подготовки и переподготовки (переквалификации) индивидуума на оптимум его трудоспособности».

Основными задачами реабилитации являются обеспечение пациенту наилучших условий не только медицинских, но и моральных, физических, профессиональных, общественных с тем, чтобы он мог в кратчайший срок вернуться к активной деятельности в обществе. Многоплановость задач реабилитации обуславливает необходимость условного деления ее направления на виды и аспекты: медицинский, психологический, социальный, профессиональный, педагогический. К медицинской реабилитации относятся все виды лечебно-диагностических процедур, направленные на восстановление функциональных особенностей органа или организма в целом, его психологического статуса, на профилактику и ликвидацию осложнений и рецидивов заболевания с помощью медикаментозного, хирургического, санаторно-курортного лечения, трудо- и физиотерапии, а также на предупреждение прогрессирования заболеваний путем проведения мероприятий по вторичной профилактике.

В настоящее время достигнуты определенные успехи в лечении больных с нарушенной функцией иммунной системы в стационарных условиях. На большом числе различных групп пациентов испытана терапевтическая эффективность многих иммуномодуляторов: тактивина, тималина, миелопида, спленина, тимогена, нуклеината натрия, интерферона, продигиозана, димефосфана, вилозена, тимункса, тимусмулли, имунокса, сандиммуна, гамимуна N, липида, полиоксидония. Кроме того, в клиническую практику внедрены такие методы коррекции нарушений иммунной системы, как иммуносорбция, плазмаферез, метод введения аутологических макрофагов, метод экстракорпоральной иммунофармакотерапии.

Многочисленные примеры из опыта последних двух десятилетий свидетельствуют об эффективности реабилитационных мероприятий на санаторно-курортном этапе, после которого при правильно организованном лечении, направленном на восстановление трудоспособности, большинство больных полноценно возвращаются к своей прежней работе.

Если в реабилитации иммунной системы в стационарных условиях накоплен богатый опыт, то проблема иммуномодулирующей терапии на санаторно-курортном этапе еще включает много вопросов, решение которых позволит широко использовать данный принцип в практической медицине.

Неизбежно возникает вопрос: «Знаем ли мы, иммунологи, как действуют на иммунную систему в норме и при патологии преформированные курортные и физические факторы?».

Мы говорим: «Данный курорт – кардиологического профиля, данный – неврологического, данный – гинекологического». Сегодня мы можем уже сказать: «Данный курорт – иммунологического профиля». И это большой шаг вперед, ибо иммунологические механизмы лежат в основе развития многих заболеваний, которые показаны для санаторно-курортного лечения [1,11,12,17,19-21].

С различными дефектами иммунной системы миллионы людей направляются в санаторно-курортные учреждения, как правило, об этих нарушениях не знают ни те, кто направляет, ни те, кого направляют, и ни те, кто их принимает на лечение. Проводя комплексную терапию заболеваний, врачи не достигают желаемых результатов. Зачастую это связано с тем, что они не знают, как действуют те или иные природные и физические факторы на главное или сопутствующее патогенетическое звено в развитии болезни – на иммунный гомеостаз человека. В природе очень много целебных факторов, которые оказывают определенное воздействие на иммунный статус организма как в норме, так и при различных патологических состояниях. Изучение этого вопроса является актуальнейшей задачей современной медицины. А его решение позволит врачам в зависимости от ситуации регулировать функцию иммунного гомеостаза человека не только лекарствами, но и немедикаментозными, курортными и физическими факторами самостоятельно или в комплексе с медикаментозными средствами.

Необходимо учитывать, что больные приезжают на курорт в основном в стадии ремиссии, когда нарушения иммунологических параметров не столь выражены. Но это не значит, что их иммунная система функционирует нормально. В связи с этим необходимо совершенствовать методы, позволяющие объективно оценить ее состояние в курортных условиях.

Следует также изучить механизмы иммуномодулирующего действия отдельных преформированных факторов (радоновые, сероводородные, иодобромные ванны, питьевые минеральные воды, климат, спелеотерапия, морские ингаляции) на каждом курорте самостоятельно с учетом местных особенностей.

Совершенствование, с одной стороны, и унифицированность, с другой, иммунологических методов исследования являются обязательным условием качественного уровня диагностических тестов. В настоящее время на многих курортах изучаются те или иные параметры клеточного или гуморального иммунитета с применением различных методов, в связи с чем сопоставление полученных результатов в различных лабораториях становится затруднительным или невозможным. Необходимо согласовать перечень обязательных иммунологических тестов для всех центров и дополнительных для каждого в отдельности и ознакомить с их возможностями медицинских работников курортов. Проводимые исследования мало координируются, носят разрозненный характер и решают вопросы «местного значения».

В стационаре, независимо от его географического положения, каждый лекарственный иммуномодулятор имеет однотипное действие на больных. Влияние же одинаковых по характеру преформированных курортных факторов в различных регионах страны может обладать совершенно противоположным воздействием. Поэтому необходимо разработать четкие критерии, определяющие назначение тех или иных курортных и физических факторов при патологии иммунной системы, изучить механизмы их иммуномодулирующего действия, разработать показания и противопоказания к их применению в зависимости от возраста больных и стадии заболевания, отработать клинические и лабораторные, в том числе иммунологические тесты оценки эффективности действия изучаемых естественных факторов, установить оптимальные условия для их назначения (разовые и курсовые дозы, способы применения, продолжительность каждой процедуры, возможность сочетания между собой, с лекарственными иммуномодуляторами и с другими медикаментозными средствами, выявление осложнений), разработать превентивные и противорецидивные меры. Знание всего этого позволит врачам проводить патогенетически обоснованное лечение дефектов иммунной системы.

Иммуномодулирующий эффект курортных и преформированных физических факторов может быть усилен путем их дифференцированного применения с учетом клинических особенностей и состояния функционирования иммунной системы, а также индивидуальных особенностей больного. Под воздействием природных и преформированных физических факторов включаются многоступенчатые системы целостного организма, которые делятся на восемь ступеней – от рефлекторных реакций, развивающихся при участии субкортикальных и кортикальных структур мозга, до изменений тканевого метаболизма, оказывающих влияние на реактивность клеточных структур и систем, участвующих в реализации лечебного эффекта. Вызванные физическими факторами реакции на каждой ступени отражаются

на функциональном состоянии иммунной системы. В частности, при радонотерапии энергия дочерних продуктов распада радона взаимодействует с нервными рецепторами кожи и другими кожными элементами. Нервнорефлекторное влияние радоновых ванн обуславливает подавление активности передней доли гипофиза и глюкокортикоидной функции коры надпочечников с последующим снижением активности воспалительного процесса и аутоиммунных реакций.

Есть все основания полагать, что многие физиотерапевтические и бальнеологические процедуры (массаж, определенные комплексы ЛФК, грязелечение, ванны, УВЧ) действуют посредством усиления тканевого лимфотока и интенсификации рециркуляции лимфоцитов в организме. Однако проблема в таком плане ранее не формулировалась, систематические исследования в этом направлении отсутствуют. Целесообразно их организовать, чтобы более точно сформулировать критерии показаний в успешности данных процедур. Сочетанное применение курортных и преформированных физических факторов с медикаментозными иммуномодуляторами существенно повышает эффективность иммунореабилитации.

Естественно, решение этих вопросов за год или два является нереальным. Но работа в этом важном направлении в дальнейшем приведет медицинскую практику к вопросу о создании иммунологических отделений в санаториях и даже специализированных санаториев – реабилитационных центров иммунологического профиля на многих курортах.

Курорт Цхалтубо имеет все основания называться в этом деле «пионером». Здесь организован реабилитационный (лечебный) центр по восстановлению защитных сил организма, функционирующий параллельно с Институтом аллергологии, астмы и клинической иммунологии АН Грузии. Создание такого лечебно-диагностического модуля реабилитации больных с дисбалансами или патологией иммунной системы на курортах является наиболее оптимизированным вариантом и может быть рекомендовано для примера [11,13,14,17,19,20].

Обосновывая современную концепцию иммунореабилитации, мы выделили два ее основных направления: специализированная и прикладная иммунореабилитация. Специализированные иммунореабилитационные мероприятия должны проводиться в тех случаях, когда симптомы иммунопатологического состояния преобладают в патогенезе заболевания. С такой ситуацией сталкиваются при трансплантационной болезни, а также при аллергических и аутоиммунных заболеваниях, когда иммунопатология проявляется инфекционным, опухолевым или иммунопролиферативным синдромом. В системе специализированных мероприятий иммуно-

коррекция занимает ведущее место и проводится только специалистами-иммунологами в рамках специализированных реабилитационных учреждений иммунологического профиля. В других случаях эти изменения столь значительны, что требуют иммунокоррекции. Тем не менее, при этом иммунореабилитационные мероприятия являются прикладными, вторичными. Если в первом случае иммунореабилитация обязательна и проводится в специализированных учреждениях иммунологического профиля, то во втором, несмотря на то, что больные могут пользоваться консультацией специалиста-иммунолога, лечение они получают, как правило, на базе медицинских учреждений по профилю основного заболевания.

Кроме того, полученные новые знания позволили по другому взглянуть на проблемы иммунореабилитации больных с нарушенной функцией иммунной системы. Исходя из общих основополагающих принципов иммунореабилитации, а также анализа собственного фактического научного материала, данных моих учеников и литературы, мы постарались обосновать стратегию и тактику комплексной иммунореабилитации больных с нарушенной функцией иммунной системы [17,19], имеющих склонность к хроническому, рецидивирующему течению, а также разработать основные принципы, подходы и методы иммунореабилитации с учетом иммунопатогенетических особенностей заболевания. Патогенетическая роль иммунных нарушений в процессе формирования хронических воспалительных заболеваний широко обсуждается в научной печати. Сложность патогенеза, каскадность патологических процессов и многообразие механизмов его реализации, а также глубина иммунных повреждений, которые могут развиваться как локально, так и в организме в целом, указывают на невозможность быстрого восстановления нарушенных функций иммунной системы и достижения стойкой клинико-иммунологической ремиссии при однократном проведении иммунореабилитационных мероприятий. Успешное решение этой проблемы связано с правильным подходом к восстановлению функционирования иммунной системы. Приводим краткую обобщающую справку о методах и подходах к иммунореабилитации больных с нарушенной иммунной системой, описанной в литературе, процесс развития которой шел от простого к более сложному [19].

Не обсуждая подробно все применяемые в процессе разработки иммунореабилитационные программы, их достоинства и недостатки, остановимся на основных положениях, которые вытекают из результатов ранее проведенных нами клинико-иммунологических исследований, их ретроспективного анализа и являются общими для иммунозависимых заболеваний с хроническим течением.

Как уже было сказано ранее, характерной особенностью таких заболеваний являются глубокие и стойкие нарушения механизмов регуляции и взаимодействия иммунокомпетентных клеток в процессе иммунного ответа, приводящие к разбалансировке в цитокиновой системе регуляции и вытекающие из этого явления повышенной апоптотической гибели эффекторных клеток.

Следовательно, комплексная программа иммунореабилитации больных с нарушенной функцией иммунной системы должна состоять из многих компонентов и подходов, предусматривающих как целевую направленную коррекцию выявленных количественных и функциональных иммунных нарушений на клеточном и субклеточном уровнях с помощью медикаментозных и немедикаментозных методов иммунокоррекции, оказывающих множественное действие и способствующих процессам восстановления, так и, учитывая длительность процесса достижения клинико-иммунологической ремиссии, создать условия для достижения пролонгированности положительного воздействия и его закрепления в процессе иммунореабилитации.

Больные с нарушенной функцией иммунной системы требуют длительной, планомерной, дифференцированной и патогенетической иммунореабилитации, соответствующей уровню выявленных клинико-иммунологических нарушений, с применением на всех этапах лечения иммунокорректирующих препаратов или методов, позволяющих нормализовать иммунный дисбаланс. Проводимая больным комплексная иммунореабилитация должна быть поэтапной и проходить обязательно под контролем иммунологического мониторинга. При рецидивирующем течении болезни поэтапное лечение является патогенетически обоснованным, способствует регрессии или предотвращению прогрессирования патологического процесса и закреплению клинических достижений проведенной иммунореабилитации. Процесс восстановления нарушенных функций иммунной системы при иммунопатологических заболеваниях с рецидивирующим течением должен включать: базисную, восстановительную и поддерживающую иммунореабилитацию, а также предусматривать следующие основные этапы.

Первый этап – клинический (длительность от 14 до 45 дней). Этот этап обычно проводится в условиях стационара с целью постановки достоверного клинического диагноза и установления степени иммунной патологии, либо в период обострения основного заболевания. Ранняя реабилитация больных на данном этапе заключается в назначении больному традиционного базисного этиотропного и симптоматического лечения с параллельным введением индивидуально подобранной целенаправленной иммунокорректирующей терапии

(так называемая базисная иммунореабилитация). При назначении лечения обязательно учитываются сопутствующие заболевания. Базисная иммунореабилитация представляет собой лечебно-диагностический процесс, направленный на создание необходимых условий для восстановления нарушенных систем иммунного гомеостаза, и предполагает выявление и лечение патологических состояний, которые непосредственно связаны с возникновением и развитием иммунного дисбаланса. По результатам проведенного клинико-иммунологического обследования оценивается характер и стадия сформировавшихся изменений, по дефекту в системе иммунитета определяется стартовый препарат для целенаправленной иммунокорректирующей терапии. Важным аспектом является разработка и реализация комплексной терапии, которая ускоряет положительную динамику восстановления и стабилизирует достигнутый эффект. На этой стадии (в зависимости от тяжести заболевания), по данным литературы, возможно подключение экстракорпоральных методов лечения – плазмафереза и гемосорбции (3–5 сеансов), оказывающих быстрый эффект при иммунных нарушениях.

Второй этап – амбулаторный. Этот этап иммунореабилитации самый длительный (до трех лет) и заключается в проведении восстановительного лечения в амбулаторных условиях (восстановительная иммунореабилитация). Однако, если достоверный диагноз первоначально поставлен в амбулаторных условиях и больной по состоянию здоровья не нуждается в госпитализации, то базисная и восстановительная иммунореабилитация могут осуществляться на этом этапе комплексной иммунореабилитацией. На амбулаторный этап возлагается ответственность за создание наиболее благоприятных условий для восстановления утраченных функций, в связи с чем больной нуждается в проведении комплексных мероприятий, направленных на наиболее полное восстановление здоровья. Восстановительная иммунореабилитация, прежде всего, заключается в сочетанном применении различных комбинаций иммунокорректирующих препаратов и методов, обладающих одной направленностью, но имеющих различные механизмы действия. Она ориентирована на будущее, т.е. на замедление прогрессирования, предупреждение рецидивов и осложнений, а в идеальном случае на приостановление дальнейшего развития болезни. В связи с этим комплексные мероприятия, направленные на восстановление трудоспособности лиц, утративших ее в результате заболевания, должны включать как медицинские аспекты, так и мероприятия психологического, педагогического и социального характера. Значение данного этапа достаточно велико, главной особенностью является его комплексность и многоплановость. Стратегия врача на данном этапе реабилитации должна заключаться прежде всего в индивидуальном подходе и основываться на объективной оценке степени активности процесса с учетом клинико-иммунологических

изменений, оценке психологического статуса больного. Комплекс лечебных мероприятий для каждого больного должен состоять из: медикаментозной терапии – базисной терапии (по необходимости), иммуностропных лекарственных препаратов (в зависимости от степени иммунного дисбаланса) под контролем иммунологического мониторинга, использования немедикаментозных физических методов реабилитации с учетом оценки тяжести состояния больного в данный период заболевания и ведущих клинических синдромов. В комплекс физических методов иммунореабилитации могут быть подключены: адаптационная и лечебная гимнастика, лечебный массаж, электро- и фонофорез в сочетании с иммуномодуляторами для местного воздействия на область основного воспалительного очага. Физические нагрузки и физиопроцедуры необходимо назначать с учетом сопутствующих заболеваний, в определенной последовательности с соответствующими интервалами и дозировками (начинать следует с малых доз).

Иммунореабилитация больных с нарушенной функцией иммунной системы в амбулаторных условиях должна включать в себя следующие мероприятия:

- наблюдение за развитием болезни с применением современных иммунологических, лабораторных и инструментальных методов диагностики;
- назначение на длительный срок лекарственных средств, контроль эффективности медикаментозного лечения;
- назначение иммуностропных средств и обязательное иммунологическое мониторингирование больного;
- физиотерапия (индуктотерапия, электро- и фонофорез с применением иммуномодуляторов) и лечебный массаж;
- назначение и систематическая корректировка физических нагрузок, контроль эффективности.

Третий этап – санаторно-курортный (ежегодный, не менее 24 дней в год – поддерживающая иммунореабилитация). Проводится после исчезновения признаков обострения заболевания и может следовать за клиническим или амбулаторным этапами иммунореабилитации. Является важным и обязательным этапом в системе иммунореабилитационных мероприятий, поскольку предусматривает использование дополнительных курортных и преформированных физических факторов. Проведение гипербарической оксигенации, радоновые, сероводородные, минеральные, бишофитные ванны, использование торфяной грязи и естественных пелоидов, адаптационная и лечебная гимнастика, магнитолазеротерапия и лечебный массаж позволяют уменьшить частоту обострений в 2–5 раз, ускорить процесс нормализации иммунологических показателей, отменить или до минимума уменьшить дозу кортикостероидов и неспецифических противовоспалительных препаратов, добиться стойкой клинической ремиссии.

На основании анализа результатов проведенных исследований нами разработана стратегия и тактика иммунореабилитации больных с нарушенной функцией иммунной системы [17,19].

Стратегия иммунореабилитации лиц с нарушенной функцией иммунной системы состоит в ее комплексности и учете патогенетических особенностей развития заболевания. Тактика иммунореабилитации таких пациентов предусматривает совокупность средств (методов) и приемов (основных принципов), направленных на достижение главной цели – восстановление нарушенных функций иммунной системы, следовательно, улучшение здоровья и качества жизни больного. Комплексная иммунореабилитация должна состоять из методов, оказывающих непосредственное влияние на иммунную систему, и методов экстраиммунного воздействия, способствующих восстановлению иммунной системы опосредованно. Они должны быть комплексными, дифференцированными и рациональными, последовательными и дозированными, не превышающими адаптационные возможности больного.

При проведении комплексной иммунореабилитации больным с нарушенной функцией иммунной системы и хроническим рецидивирующим течением заболевания основополагающими на всех этапах реабилитации являются следующие принципы:

- постановка достоверного клинического диагноза и определение степени иммунной патологии, обязательный учет сопутствующих заболеваний. Применение традиционных базисных фармакологических средств должно обязательно проводиться в комплексе со специализированной патогенетической иммунокоррекцией;
- индивидуальный подбор иммуностропных препаратов в зависимости от степени иммунных нарушений. Причем стартовый препарат определяется врачом в соответствии с выявленными дефектами в системе иммунитета. Для больных с длительно протекающими и часто рецидивирующими иммунопатологическими процессами необходимо использование нескольких иммуномодуляторов, имеющих различные клеточные мишени в иммунной системе;
- сочетанность системного и локального использования иммуномодуляторов оправдана, приводит к значительному улучшению как лабораторных, так и клинических показателей. Локальное применение иммуномодуляторов является патогенетически обоснованным и способствует повышению клинической эффективности проводимой иммунореабилитации;
- обязательное применение немедикаментозных методов иммунореабилитации (курортные и преформированные физические факторы);
- индивидуальный подбор, последовательность и дозированность медикаментозной и немедикаментозной терапии. Оптимальным считается сочетанное применение методов и препаратов, обладающих одной

направленностью, но имеющих различные механизмы действия;

- этапность, непрерывность и преемственность ведения больного.

Имунореабилитационные мероприятия должны проводиться последовательно и непрерывно на всех этапах комплексного лечения больного: стационар – амбулаторий – санаторий с учетом положительной динамики клинико-иммунологических изменений, достигнутых на предыдущем этапе иммунореабилитации, и стремиться к достижению восстановления физиологических параметров иммунной системы и соблюдением особенностей нормы для исследуемого региона. Иммунореабилитационное лечение проводится до полного восстановления показателей и функций всех звеньев иммунитета;

- поэтапное иммунологическое мониторирование больных;

- пролонгированность и цикличность (многоступенчатость) проведения курсов иммунореабилитационных мероприятий. Количество циклов определяется степенью иммунных нарушений, выявленных при иммунологическом исследовании, и может колебаться от 2–3 до 5–6 и более. Длительность сочетанной амбулаторно-санаторной иммунореабилитации составляет не менее трех лет;

- сроки начала иммунореабилитации – с момента установления иммунной патологии.

В результате разработанных нами основных принципов и методов иммунореабилитации больных с нарушенной функцией иммунной системы положительные клинико-иммунологические эффекты со стойкой клинической ремиссией (до 12 месяцев и более) наблюдаются у 95–98% больных. Находясь на переломном отрезке времени, в заключение следует подчеркнуть, что изучение иммунореабилитологии находится в начале длительного пути и результаты будущих исследований позволят ей занять заслуженное и достойное место среди научных дисциплин [17,19,20].

Резюмируя общие положения результатов проведенных исследований по обоснованию нового направления – иммунореабилитации больных с нарушенной функцией иммунной системы – необходимо выделить ее основные принципы.

Цель иммунореабилитации – восстановление нарушенного иммунного гомеостаза организма, выражающееся в нормализации иммунологических параметров и выздоровлении больного при остром течении болезни или достижении стойкой ремиссии процесса при хронических формах. Здесь целесообразно подчеркнуть наше понимание разницы между иммунокоррекцией и иммунореабилитацией. Критерием эффективности иммунокоррекции является доведение одного или не-

скольких иммунологических показателей до нормальных величин. Например, если под воздействием лечебных факторов у больного с часто рецидивирующим хроническим бронхитом удалось скорректировать CD3, CD4 или соотношение CD4/CD8, то это иммунокоррекция. Однако при этом клинический эффект может не наблюдаться, а через некоторое время опять может выявиться дисбаланс иммунорегуляторных клеток. Но если под воздействием применяемых лечебных факторов иммунная система доходит до своих способностей восстановиться в своих правах и рецидивы хронического бронхита исчезают совсем или сводятся к минимуму, ремиссия резко удлиняется, т.е. она становится стойкой, то тогда, мы можем судить об иммунореабилитации больных с нарушенной функцией иммунной системы.

Условие назначения – достоверность диагноза как основного, так и сопутствующего.

Сроки начала иммунореабилитации – с момента установления иммунной патологии (в некоторых случаях предполагаемой иммунной недостаточности) и постановки точного клинического диагноза с учетом всех особенностей проявления основного заболевания, его осложнений и сопутствующей патологии.

Характер – строго индивидуальный.

Методы иммунореабилитации – дифференцированные, рациональные, комплексные, сочетающие курортные и преформированные физические факторы с лекарственными иммуномодуляторами. Процедуры должны назначаться в определенной последовательности с соответствующими интервалами и дозировками. Это особенно важно, так как последовательное применение процедур может как усиливать действие друг друга, так и ослаблять. Например, нами показано, что при лечении больных хроническим бронхитом спелеотерапия должна на 2-3 ч предшествовать радоновым бальнеопроцедурам, а ЛФК и массаж необходимо назначать им раньше других с утра (9-11 ч), т.е. должен соблюдаться принцип адаптогенных (подготавливающих) и тренирующих процедур.

Весьма важно, чтобы количество используемых иммунореабилитационных процедур не превышало адаптационные возможности организма. Они должны начинаться с малых доз и проводиться по принципу гипосенсибилизации, что в конечном итоге способствует лучшей переносимости адаптационного периода. Однако необходимо отметить, что эффективность иммунореабилитации зависит не только от дозы и схемы применения процедур, но и от механизмов их действия и состояния функциональной системы гомеостаза.

Непрерывность и преемственность должна быть абсолютной на всех этапах иммунореабилитации:

- а) клиника института или иммунологическое отделение больницы, госпиталя;
- б) санаторий или реабилитационный центр иммунологического профиля;
- в) поликлиника по месту жительства или при клинике института.

Каждый последующий этап иммунореабилитации необходимо начинать с учетом достигнутых на предыдущем этапе результатов. Осознавая важность диагностических иммунологических тестов, представляется обязательным применение на всех этапах реабилитации идентичных методов оценки иммунного статуса для возможного их сравнительного изучения. При этом следует учесть, что постоянное динамическое наблюдение за больным и регулярный иммунологический мониторинг являются обязательным условием иммунореабилитации. В связи с этим особо актуальным становится своевременное создание ее организационных структур типа специализированных иммунологических отделений в санаториях или реабилитационных центрах иммунологического профиля, иммунологических отделений в больницах и госпиталях, иммунологических кабинетов в поликлиниках, в которых наряду с реабилитационными подразделениями должны функционировать диагностические иммунологические лаборатории.

Проблема реабилитации больных с нарушенной функцией иммунной системы является одной из главных проблем иммунореабилитологии, науки, основоположником которой мне посчастливилось стать и которую на современном этапе можно рассматривать следующим образом:

Иммунореабилитология – это наука, изучающая процессы восстановления функциональной активности иммунной системы до физиологической нормы под воздействием комплекса лечебно-профилактических системных мероприятий как медикаментозных, включая лекарственные иммуномодуляторы, так и немедикаментозных для достижения полного выздоровления больного при остром течении болезни или стойкой клинко-иммунологической ремиссии при исчезновении или минимизации рецидивов при хронической ее форме.

Оставаясь в неразрывной связи с клинической иммунологией, за последние годы иммунореабилитология доказала свою индивидуальность и самостоятельность, а методы иммунореабилитации в настоящее время используются почти во всех медицинских и санаторно-курортных учреждениях [17,19].

В настоящее время отмечается бурный рост иммунозависимых заболеваний с их реструктуризацией в сторону превалирования хронических патологических процессов, развивающихся на фоне дезадаптации иммунной системы и увеличения числа преморбидных состояний. Практически нет такого патологического процесса, который в той или иной мере не проявлялся бы на уровне изменений в иммунной системе, которая представляет собой сложную цепь взаимозависимых клеточных и молекулярно-генетических процессов, включающих в себя как механизмы обратной связи, так и введение в работу резервных клеток и направленную экспрессию специфических рецепторов для регуляторных молекул на определенных, необходимых в данный момент клетках-мишенях.

Развитие вторичных иммунодефицитных состояний может быть следствием полифакторного воздействия на систему иммунитета антропогенных факторов химической и физической природы, инфекционных агентов как бактериальных, так и вирусных, определенных лекарственных препаратов (антибиотики, глюкокортикоиды, неспецифические противовоспалительные препараты, иммунодепрессанты), белкового голодания, недостатка витаминов, применения некачественных пищевых продуктов, хирургического вмешательства, травмы, психоэмоционального стресса.

Длительная активация иммунной системы является одним из патогенетических факторов срыва адаптационных механизмов, что обуславливает хронизацию воспалительного процесса.

Одним из бурно развивающихся за последние годы направлений является разработка таргетных фармакологических препаратов, целенаправленно влияющих на те или иные звенья иммунной системы. Однако разработка нового оригинального препарата требует длительного времени (5–12 лет) при очень больших финансовых затратах. С другой стороны, к разработке, производству и внедрению новых лекарственных препаратов предъявляются очень серьезные нормативные требования по сертификации и лицензированию согласно GLP (Good Laboratory Practice – надлежащая лабораторная практика), GMP (Good Manufacturing Practice – надлежащая производственная практика), GCP (Good Clinical Practice – надлежащая клиническая практика) [23].

Другой важной составляющей при разработке новых препаратов, в том числе и иммуномодуляторов, а также новых методов иммунореабилитации является внедрение принципов персонализации в этот очень сложный процесс. Как известно, персонализированная медицина построена на принципах 4П:

- предиктивность, превентивность,
- персонализация, партисипативность.

По данным литературы, к 2017 году доля персонализированных лекарственных средств будет составлять треть всех фармацевтических препаратов в общем объеме мирового выпуска.

Иммунная система способна распознавать и разрушать опухолевые клетки. Решающую роль в опухолеассоциированной иммуносупрессии играет нарушение регуляции взаимодействия сигналов с соответствующих костимуляторов и коингибиторов рецепторов, так называемых «контрольных точек иммунитета» – immune “checkpoints”, модулирующих процесс активации Т-лимфоцитов – основных участников противоопухолевого иммунитета. Применение в клинике при ряде злокачественных опухолей mAb против некоторых негативных регуляторов иммунитета, таких как молекулы CTLA-4 и PD-1/PD-L1, имело значительный терапевтических успех.

Оригинальный, принципиально новый и высоко эффективный метод иммунотерапии рака разработан американским ученым Джеймсом Эллисоном из Техасского университета. Вместо того чтобы нацелиться на специфические опухоли, он изучал специфический белок CTLA-4 (CD 152), подавляющий способность иммунной системы атаковать клетки опухоли, и обнаружил, что блокирование этого белка, образно говоря, «спускает с привязи» Т-клетки иммунной системы, и они целенаправленно начинают уничтожать опухолевые клетки. Наиболее эффективный результат был получен у пациентов с меланомой при использовании CTLA-4 моноклональных антител (Ипилимумаба).

Клиническую эффективность также продемонстрировали анти-PD-L1 и PD-L2 моноклональные антитела (Ниволумаб и Пембролизумаб). Очень перспективными при изучении проблем иммунотерапии рака является исследование молекулярно-генетических аспектов регуляции иммуноопосредованных таргетных противоопухолевых вакцин, опухолеспецифических клонов Т-лимфоцитов, НК-клеток [2,9,23,24].

В настоящее время нельзя останавливаться на достигнутом, а необходимо наметить будущие перспективы. Особенно актуально сегодня стоит вопрос об иммунореабилитации людей, подвергшихся воздействию различных экологически неблагоприятных факторов, иммунореабилитации при старении, СПИДе, после перенесенных тяжелых травм, включая хирургическую.

Не менее актуальным является изучение различных механизмов иммунореабилитации, а также разработка ее фундаментальных основ. В этом плане перспективными являются работы, исследующие характер взаимосвязей между показателями иммунной системы и другими системами организма (нервной, эндокринной, дыхательной,

кровообращения). Поэтому только констатация тех или иных иммунологических нарушений без выяснения возможных этиологических факторов иммунологической недостаточности, механизмов патогенеза, без учета клинико-функциональных, биохимических изменений организма больного, всего разнообразия клинических форм и стадий заболевания с установлением непосредственного дефекта в иммунной системе вряд ли поможет больному; только комплексное изучение всех параметров, тщательный клинико-иммунологический мониторинг являются основой для выбора и проведения эффективной иммунореабилитации.

Несмотря на достигнутые успехи, необходимо подчеркнуть, что это только лишь начало большого, тернистого, однако весьма значимого пути, который нам необходимо обязательно пройти вместе. Уже сейчас в названии многих научных, научно-практических, лечебных учреждений мы встречаем слово «иммунореабилитация»; многие ученые проводят исследования в области иммунореабилитации.

Задача каждого, кто посвятит свою научно-практическую деятельность изучению проблем иммунореабилитации – внести свой посильный вклад в эту значимую для здоровья людей отрасль медицинской науки. А ведущей и координирующей структурой в сфере дальнейшего изучения вопросов иммунореабилитации стала Всемирная организация по иммунопатологии (WIPO), штаб-квартира которой находится в Москве. Под эгидой WIPO будут организованы иммунореабилитационные центры во многих регионах России, а также в США, Израиле, Германии, Республике Чехии, Австрии, Болгарии, Венгрии, Австралии, Таиланде, Сингапуре, Польше, Голландии, на Кипре.

Таким образом, чуть более чем за 100-летнюю историю был пройден путь от начала применения иммунотерапии (первого использования дифтерийного анатоксина при лечении дифтерии) к персонализированной таргетной иммунореабилитации.

Мы находимся на начальном этапе новой эры, на пороге достижений в клинической иммунологии, которые будут способствовать разработке новых методов персонализированной таргетной иммунореабилитации больных с нарушенной функцией иммунной системы [11,13,17,19,20].

ЛИТЕРАТУРА

1. Басов А.А., Барышев М.Г., Быков И.М., Павлюченко И.И., Джимаков С.С., Сепиашвили Р.И. Воздействие воды с модифицированным изотопным составом на интенсивность свободнорадикальных процессов в эксперименте на лабораторных животных // Аллергология и иммунология. 2012. Т. 13. № 4. С. 314.
2. Кадагидзе З.Г., Черткова А.И., Заботина Т.Н и др. Новые

возможности регуляции противоопухолевого иммунного ответа // Злокачественные опухоли. 2015. № 1. С. 24.
3. Малашхиа Ю.А., Сепиашвили Р.И., Надареишвили З.Г., Малашхиа Н.Ю. Проблемы неврологической и иммунологической памяти и перспективы реабилитации (основы и концепция) // International Journal on Immunorehabilitation (Международный журнал по иммунореабилитации). 1996. № 2. С. 53.
4. Мачарадзе Д.Ш., Сепиашвили Р.И. Эпидемиология бронхиальной астмы у детей по данным литературы и программы ISAAC // Астма. 2000. Том 1. № 1. С. 44.
5. Мачарадзе Д.Ш., Шанидзе М.А., Джишкарквани И.Р., Беридзе В.Д., Чихладзе М.В., Сепиашвили Р.И. Распространенность аллергических заболеваний у детей по данным литературы и ISAAC // Астма. 2005. Том 6. № 1-2. С. 11.
6. Нестерова И.В., Балмасова И.П., Козлов В.А., Малова Е.С., Сепиашвили Р.И. Синдром хронической усталости и иммунной дисфункции у лиц с рецидивирующими вирусными инфекциями: клинико-иммунологические черты и особенности серотонинергической регуляции // Цитокины и воспаление. 2006. Т. 5. № 2. С. 3.
7. Петров Р.В. Иммунореабилитация и стратегия медицины // International Journal on Immunorehabilitation (Международный журнал по иммунореабилитации). 1994. Т. 1. № 1. С. 5.
8. Петров Р.В., Сепиашвили Р.И. Проблемы реабилитации иммунной системы. // Аллергология и иммунология. 2015. Т. 16. №1. С. 40.
9. Северин Е.С. Новые подходы к избирательной доставке лекарственных препаратов в опухолевые клетки // Успехи химии. 2015. Т. 84. № 1. С. 43.
10. Сепиашвили Р.И. Введение в иммунологию. Цхалтубо. 1987. 230 с.
11. Сепиашвили Р.И. Иммунореабилитология на рубеже веков // International Journal on Immunorehabilitation (Международный журнал по иммунореабилитации). 2000. Том 2. № 1. С. 5.
12. Сепиашвили Р.И. Иммунотропные препараты: классификация, проблемы и перспективы // Аллергология и иммунология. 2001. Том 2. № 1. С. 39.
13. Сепиашвили Р.И. Основы физиологии иммунной системы. М.: Медицина – Здоровье, 2003. 240 с.
14. Сепиашвили Р.И. Физиология иммунной системы. М.: Медицина – Здоровье, 2015. 328 с.
15. Сепиашвили Р.И., Балмасова И.П. Естественные киллеры и биогенные амины: паракринная регуляция в иммунной системе // Росс. физиол. ж. им. И.М. Сеченова. 2005. Том 91. № 8. С. 927.
16. Сепиашвили Р.И., Балмасова И.П. Иммунные синапсы: от теории к клинической практике // Молекулярная медицина. 2008. № 1. С. 14.
17. Сепиашвили Р.И., Балмасова И.П., Славянская Т.А. Современная концепция иммунореабилитации // International Journal on Immunorehabilitation (Международный журнал по иммунореабилитации). 1997. № 6. С. 5.
18. Сепиашвили Р.И., Малашхиа Ю.А. Мозг – один из центральных органов иммунной системы // International

Journal on Immunorehabilitation (Международный журнал по иммунореабилитации). 1995. №1. С.3.

19. Сепиашвили Р.И., Славянская Т.А. Стратегия и тактика комплексной иммунореабилитации больных с заболеваниями иммунной системы // International Journal on Immunorehabilitation (Международный журнал по иммунореабилитации). 1999. № 11. С. 5.

20. Сепиашвили Р.И., Славянская Т.А. Иммунореабилитация: Проблемы и перспективы // Сибирский научный медицинский журнал. 1998. №2. С.24.

21. Сепиашвили Р.И., Балмасова И.П. Иммунные синапсы: от теории к клинической практике // Молекулярная медицина. 2008. №1. С.14-22.

22. Сепиашвили Р.И., Балмасова И.П. Естественные киллеры и их рецепторы, специфичные к МНС-1 // Иммунология. 2006. Т.27. №1. С.46-51.

23. Сепиашвили Р.И., Балмасова И.П. Естественные киллеры и биогенные амины: паракринная регуляция в иммунной системе // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. 2005. Т.91. №8. С.927.

24. Славянская Т.А., Сепиашвили Р.И. Роль цитокинов в иммунопатологии // Аллергология и иммунология. 2004. Том 5. № 1. С. 42.

25. Славянская Т.А., Сепиашвили Р.И., Вишняков М.Н., Чихладзе М.В. Иммунологический мониторинг больных хроническим бронхитом в динамике восстановительной иммунореабилитации // International Journal on Immunorehabilitation (Международный журнал по иммунореабилитации). 1999. №11. С.70.

26. 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. С. 30.

27. Хавинсон В.Х. Пептидная регуляция старения. СПб.: Наука, 2009.

28. Baldueva I.A., Novik A.V. Prognostic and predictive significance of HLA expression in patients with melanoma receiving immunotherapy // JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft. 2013. V. 11(Suppl. s7). P.71.

SUMMARY

IMMUNOREHABILITATOLOGY: A LOOK FROM THE SOURCES TO THE FUTURE. FROM IMMUNOTHERAPY TO PERSONALIZED TARGETED IMMUNOREHABILITATION

Sepiashvili R.

Peoples Friendship University of Russia, Moscow; National Institute of Allergology, Asthma and Clinical Immunology of Georgian Academy of Sciences, Tskhaltubo, Georgia; Institute of Immunology, Moscow, Russia

Development and introduction of modern clinical diag-

nostic tests (that allow to evaluate the functional system of immune homeostasis) into medical practice, a huge body of evidence on the leading role of the immune system in pathogenesis most acute and chronic diseases and even identification of specific nosological forms of immune-mediated diseases forced the scientists to search and develop new tools and techniques that have therapeutic effects on the impaired immune homeostasis and restore it to the normal state.

The introduction of a new concept – immunorehabilitation – was an impetus for the accumulation of new knowledge and a catalyst for research in clinical immunology. It was Revaz Sepiashvili who breathed life into the concept of immunorehabilitation. He was lucky to be at its origin. He became not only the founder of the brand new scientific field – immunorehabilitation, but also the founder of a new medical science – immunorehabilitology. In this paper, the author returns to the roots and recalls the way that medical science has gone before coming to understand immunorehabilitology and tells readers about current successes and its development prospects.

Keywords: immunorehabilitology, immunorehabilitation, immunomodulators, immunotherapy, immunosuppression, classification of immunomodulators, immunotropic preparations, rehabilitation, immune system physiology, immunophysiology, sanatorium–resort rehabilitation.

РЕЗЮМЕ

ИММУНОРЕАБИЛИТОЛОГИЯ: ВЗГЛЯД ОТ ИСТОКОВ В БУДУЩЕЕ. ОТ ИММУНОТЕРАПИИ К ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННОЙ ТАРГЕТНОЙ ИММУНОРЕАБИЛИТАЦИИ

Сепиашвили Р.И.

Российский университет дружбы народов, Москва; Национальный Институт аллергологии, астмы и клинической иммунологии АН Грузии; Институт иммунофизиологии, Москва, Российская Федерация

Разработка и внедрение в практическую медицину современных клинико-диагностических тестов оценки функциональной системы иммунного гомеостаза, бурный рост данных о ведущей роли иммунной системы в патогенезе возникновения и развития большинства острых и хронических заболеваний и даже выделение в отдельные нозологические формы заболеваний этой системы, поставили перед учеными вопрос о разработке и изыскании новых средств и методов, оказывающих терапевтическое воздействие на восстановление нарушенного иммунного гомеостаза человека.

Толчком к накоплению нового уровня знаний и катализатором научных исследований в клинической

иммунологии послужило внедрение нового понятия – иммунореабилитация. Чуть более 30 лет прошло с публикации первых работ по этой проблеме. Именно автор представленной статьи вдохнул жизнь в понятие иммунореабилитация. Ему посчастливилось быть у истоков ее зарождения и стать не только основоположником совершенно нового научного направления

– иммунореабилитации, но и основателем новой медицинской науки – иммунореабилитологии. В данной работе автор возвращается к истокам и вспоминает путь, который прошла медицинская наука, прежде чем прийти к пониманию иммунореабилитологии, а также рассказать читателям о современных ее успехах и перспективах развития.

რეზიუმე

იმუნორეაბილიტოლოგია: ხედვა საწყისიდან მომავლისაკენ.
იმუნოთერაპიიდან პერსონალიზებული მიზნობრივი იმუნორეაბილიტაციისაკენ

რ. სეფიაშვილი

რუსეთის ხალხთა მეგობრობის უნივერსიტეტი, მოსკოვი; საქართველოს მაცნიერებათა აკადემიის აღდგოლოგიის, ასთმის და კლინიკური იმუნოლოგიის ეროვნული ინსტიტუტი; იმუნოფიზიოლოგიის ინსტიტუტი, მოსკოვი, რფ

პრაქტიკულ მედიცინაში იმუნური ჰომეოსტაზის ფუნქციური სისტემის შეფასების თანამედროვე კლინიკურ-სადიაგნოსტიკო ტესტების შექმნამ და დანერგვამ, მონაცემთა მნიშვნელოვანმა ზრდამ მრავალი მწვავე და ქრონიკული დაავადების წარმოშობასა და პათოგენეზში იმუნური სისტემის წამყვანი როლის შესახებ, ამ ფუნქციური სისტემის დარღვევათა გამოყოფამ დამოუკიდებელ ნოზოლოგიურ ფორმებადაც კი მეცნიერთა წინაშე დასვა საკითხი ადამიანის იმუნური ჰომეოსტაზის აღდგენის თერაპიული ეფექტის განმსაზღვრელი ახალი საშუალებებისა და მეთოდების ძიებისა და შემუშავების

შესახებ. კლინიკური იმუნოლოგიის სამეცნიერო კვლევების კატალიზატორი გახდა ახალი ცნება – იმუნორეაბილიტაცია. სწორედ რ.ი. სეფიაშვილმა შთაბერა სული იმუნორეაბილიტაციის ცნებას. იგი არის არა მარტო ახალი სამეცნიერო მიმართულების – იმუნორეაბილიტაციის დამაარსებელი, არამედ, ახალი სამედიცინო მეცნიერების – იმუნორეაბილიტოლოგიის ფუძემდებელი. ნაშრომში ავტორი უბრუნდება სათავეებს და იხსენებს გზას, რომელიც სამედიცინო მეცნიერებამ განვლო იმუნორეაბილიტოლოგიის გააზრებამდე, მოუთხრობს მკითხველს ამ მეცნიერების თანამედროვე მიღწევებსა და განვითარების პერსპექტივებზე.

ОСНОВНЫЕ ЭТАПЫ ПРИГОТОВЛЕНИЯ ЖИЗНЕСПОСОБНЫХ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК РАКА МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ: ОТ ВЫДЕЛЕНИЯ ОПУХОЛЕВОГО МАТЕРИАЛА ДО КРИОКОНСЕРВАЦИИ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ

^{1,2}Славянская Т.А., ^{1,3}Сальникова С.В.

¹Российский университет дружбы народов; ²Институт иммунофизиологии;
³ФГБУ Клиническая больница №1 Управления делами Президента РФ, Москва, Россия

В последнее десятилетие достигнуты несомненные успехи в лечении злокачественных опухолей, в первую очередь, вследствие прогресса лекарственной терапии, основанной на достижениях молекулярной биологии, иммунологии, понимании механизмов опухолевой прогрессии, взаимоотношения иммунной системы и опухоли, процессов, происходящих в опухолевом микроокружении. Исследования, убедительно доказавшие ведущую роль иммунной системы не только при

различных инфекционных патологиях [4,10,11,16-19], но в противоопухолевой защите организма, стали отправной точкой как для разработки различных иммунологических критериев и маркеров для диагностики и прогнозирования опухолевого процесса [14,22], так и новых методов иммунотерапии злокачественных новообразований [1-3,5-9,13,15,20]. Это создает предпосылки для разработки новых подходов и новых мишеней в лечении больных злокачественными новообразованиями

ми, использовании инновационных методов и способов лечения, технологий, которые могут обеспечить успех современной системной терапии. Одним из перспективных направлений на сегодняшний день является противоопухолевая вакциноterapia. Для генерации специфического противоопухолевого иммунного ответа наиболее перспективным является разработка аутологичных персонифицированных дендритноклеточных противоопухолевых вакцин (ПДПВ).

Разработка аутологичных ПДПВ против рака мочевого пузыря (РМП) является актуальной проблемой [8,9,13,15,20], которая охватывает множество аспектов, необходимых для ее стандартизации. В частности, необходимо оптимизировать методику получения первичной культуры опухолевых клеток из индивидуального операционного материала. В настоящее время накоплен обширный опыт культивирования разнообразных опухолевых клеток, однако нет единого мнения по поводу оптимального метода выделения жизнеспособных одиночных клеток из опухолевой ткани [21]. Традиционно, предпочтение отдают ферментативной обработке тканей, которую считают наименее травматичной для клеток, в то же время использование этого метода приводит к трудно обнаруживаемым метаболическим изменениям, в частности, к изменению проницаемости мембран и потери ими части белков, что не вызывает немедленной гибели клеток, но в дальнейшем тормозит рост культуры *in vitro*. Не вызывает сомнений тот факт, что полученный для исследований материал должен быть взят в работу немедленно, тем не менее, в условиях использования методики в клинике необходимо определить оптимально возможный промежуток времени между забором биоматериала и его посевом на питательные среды; установить температурный режим для хранения образцов опухолевого материала, что, в дальнейшем, позволит проводить специфическую иммунотерапию онкологическим больным из отдаленных медицинских учреждений. Важными аспектами также являются разработка методики получения жизнеспособных опухолевых клеток из операционного материала, подбор наиболее подходящих питательных сред и ростовых факторов для культивирования опухолевых культур, условий криоконсервации клеточных линий.

Вышеизложенное определяет несомненную актуальность проведения исследований по изучению особенностей получения, культивирования и криоконсервации клеток опухоли мочевого пузыря для создания персонифицированных противоопухолевых вакцин, что позволит не только восполнить этот пробел, но и, в дальнейшем, получить принципиально новое средство для лечения уротелиальной карциномы.

Ранее нами были освещены некоторые аспекты, связанные с особенностями культивирования клеток уротелиальной карциномы (КУК) [12]. В данной работе под-

робно рассмотрены все основные этапы приготовления жизнеспособных опухолевых клеток рака мочевого пузыря - от выделения клеток из опухолевого материала больного до криоконсервации, обеспечивающие высокую жизнеспособность выделенных клеточных культур уротелиальной карциномы.

Материал и методы. В работе использованы образцы опухоли 54 больных в возрасте от 37 до 82 лет с мышечно-инвазивной и неинвазивной формами РМП, выделенные непосредственно после проведения хирургического вмешательства. Перед забором биоматериала от всех пациентов получены письменные добровольные информированные согласия.

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 были разделены на три равные фрагмента, каждый из которых был помещен в стерильную пробирку/контейнер с ПС. Затем 3 пробирки/контейнера с одинаковым биоматериалом от каждого больного отправляли в холодильные камеры для хранения при разных температурных условиях (0°C; +4°C и +8°C) и, в дальнейшем, в течение 24 часов от момента забора биоматериала, доставляли в лабораторию. Оценку жизнеспособности проводили через каждые 24 часа в течение 6 дней.

В условиях лаборатории проводили дезагрегацию опухоли с использованием раствора Версена, Трипсина и Коллагеназы (ПанЭко, Россия) двумя методами: автоматическим механическим (с помощью Медимашини DAKO, Denmark) и энзиматическим (I вариант - с 0,25% раствором Трипсина; II вариант - с 0,2% раствором Коллагеназы II типа).

Опухолевые клетки культивировали в CO² инкубаторах (Thermo Fisher Scientific™, USA) в условиях 100% влажности при 37°C, атмосфере с 5% содержанием углекислого газа. В работе использовали культуральные флаконы с вентилируемыми крышками (Sarstedt, USA). Для улучшения адгезионных свойств культивируемых клеток поверхность флаконов предварительно покрывали 0,1% раствором желатина (Биолот, Россия).

Для оптимизации культивирования КУК подбирали условия (различные питательные среды, ростовые добавки и факторы), при которых отмечали максимальную скорость прироста КУК на 3 сутки их культивирования.

В работе использовали питательные среды DMEM/F12 с L-глутамином и RPMI-1640 с L-глутамином (Биолот, Россия), а также различные концентрации ростовой до-

бавки (5, 10, 15, 20 и 25% эмбриональной телячьей сыворотки – ЭТС, Биолот, Россия). Для этого 10 000 КУК помещали в каждую ячейку 96-и луночного планшета (Sarstedt, USA) с анализируемыми концентрациями ЭТС и ростовыми средами.

Кроме того, исследовали влияние ростовых факторов инсулина-трансферрина-селенита натрия - ITS (Invitrogen, USA), ростовой добавки для эпителиальных клеток Mammary Epithelial Cell Growth Supplement - MEGS (Thermo Fisher Scientific®, USA) и готовой бессывороточной селективной среды для культивирования эпителиальных клеток человека Panser 628 (PAN-Biotech®, USA) на скорость пролиферации КУК. ITS использовали в рекомендованном производителем разведении 1:100. Конечная концентрация компонентов в среде составляла: инсулин - 5 мкг/мл, трансферрин - 5 мкг/мл, селен - 5 нг/мл. MEGS добавлялся из расчета 5 мл добавки на 500 мл основной полной питательной среды (ППС) для получения раствора, содержащего: экстракт бычьего гипофиза (ЭБГ) - 0.4% v/v, рекомбинантный человеческий инсулино-подобный фактор-1 роста - 1 мкг/мл, гидрокортизон - 0.5 мкг/мл, рекомбинантный человеческий эпидермальный фактор роста - 3 нг/мл.

КУК культивировали в течение 3 суток в CO² инкубаторе (Thermo Fisher Scientific™, USA), затем клетки снимали двухкомпонентным раствором, содержащим одну часть 0,02 % раствора Версена (Биолот, Россия) и одну часть 0,25% раствора Трипсина (Биолот, Россия). Прирост количества КУК, предварительно окрашенного трипановым синим, осуществляли с помощью автоматического счетчика клеток Countess (Invitrogen, USA).

С целью подбора оптимальных условий для замораживания КУК 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™, USA). Для заморозки КУК снимали с культуральных флаконов двухкомпонентным раствором, содержащим одну часть 0,02 % раствора Версена (Биолот, Россия) и одну часть 0,25% раствора Трипсина (Биолот, Россия) после 3-минутной экспозиции в CO² инкубаторе (Thermo Fisher Scientific™, USA). Количество снятых клеток и их жизнеспособность оценивали в автоматическом счетчике клеток Countess (Invitrogen, USA). Суспензию клеток центрифугировали 10 минут на скорости 1000g, затем надосадочную жидкость сливали, а к осадку добавляли криосреду (КС), состоящую из: 90% ЭТС (Биолот, Россия) и 10% Диметилсульфоксида (DMSO) для культур клеток (Биолот, Россия). КУК ресуспендировали в

КС, в криопробирки вносили по 5 млн. клеток на 1 мл КС и незамедлительно помещали в холодильник при температуре -80°C, где хранили в течение 5 дней. Часть криопробирок помещали в пенопластовый контейнер, а другую часть - в программный замораживатель Mr. Frosty™ Freezing Container (Thermo Scientific™, USA) со скоростью охлаждения 1°C в минуту, оптимальной для поддержания жизнеспособности клеток. Для размораживания криопробирки помещали на 3 минуты в воду с температурой 40°C, затем КУК немедленно переносили в пробирки со средой DMEM/F12 с L-глутамином, центрифугировали 5 минут на скорости 1000g. Надосадочную жидкость сливали, добавляли ППС (DMEM/F12 с 20% ЭТС) и рассевали на культуральные флаконы. После процедуры замораживания/оттаивания клетки окрашивали раствором трипанового синего и оценивали жизнеспособность КУК, подсчитывая количество неокрашенных (живых) клеток в автоматическом счетчике клеток Countess (Invitrogen, USA).

Для математической обработки данных применяли пакет статистических программ SPSS 23.0 for Windows (SPSS, Chicago, IL, USA). Статистически значимыми считали значения с доверительным интервалом не менее 95%, при $p \leq 0,05$.

Результаты и их обсуждение. Проведенные сравнительные результаты исследования показали, что исходная жизнеспособность опухолевых клеток, выделенных от больных РМП, была различной. Тем не менее, учитывая это обстоятельство, для каждого опухолевого образца был посчитан исходный фон жизнеспособности клеток, которые в дальнейшем подвергались различным воздействиям в соответствии с поставленными в работе задачами.

Отмечено, что снижение жизнеспособности КУК в условиях 24-часовой экспозиции при температуре +4°C было минимальным - на $3,3 \pm 0,4\%$. В то же время транспортировка и хранение биоматериала в течение суток при 0°C и +8°C приводили к потере жизнеспособности опухолевых клеток на $7,14 \pm 0,7\%$ и $11,8 \pm 1,5\%$, соответственно, $p \leq 0,05$ (рис. 1).

Последующее более длительное хранение биоматериала (от 4 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 2 по 6 сутки, гибель клеток составила $9 \pm 1,9\%$ и $66,7 \pm 4,7\%$, соответственно. При других температурных режимах (0°C и +8°C) в те же сроки жизнеспособность КУК резко снижалась, в среднем, на $21,5-88,5\%$ и $32,2-92,5\%$, соответственно, $p \leq 0,01$ (рис. 2).

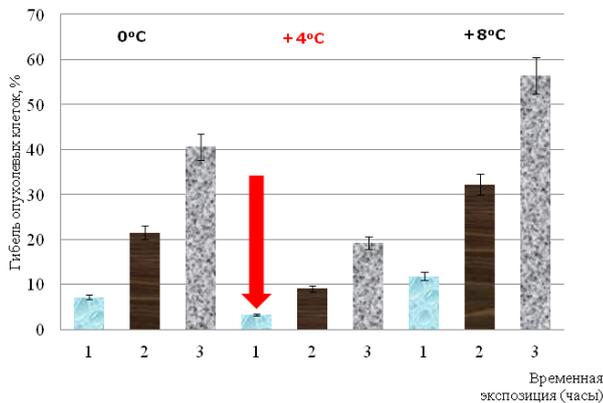


Рис. 1. Гибель КУК в зависимости от температурного режима и временной экспозиции через 24- 72 часа
примечание: 1 – 24 часа; 2 - 48 часов; 3 – 72 часа

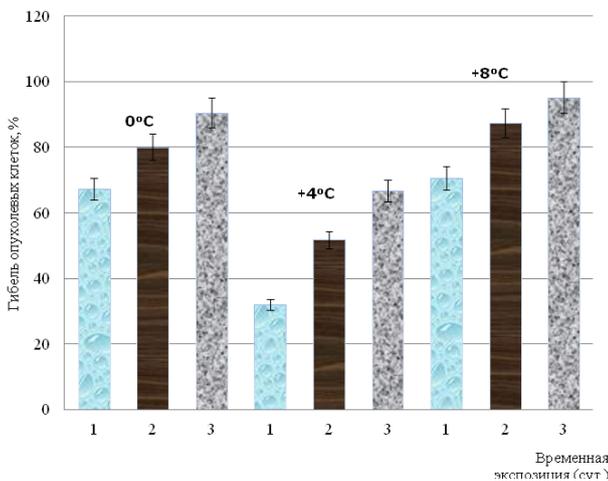


Рис. 2. Гибель клеток уротелиальной карциномы в зависимости от температурного режима и временной экспозиции на 4-6 сутки
примечание: 1 – 4 сутки; 2 – 5 сутки; 3 – 6 сутки

После определения оптимального временного и температурного режимов транспортировки и хранения, КУК, обладающие наибольшей жизнеспособностью, подвергали различным методам механической 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 КУК при механической дезагрегации биоматериала РМП была достоверно выше и составляла $81,8 \pm 6\%$ в сравнении с ферментативным способом обработки опухоли, где выживаемость при I и II вариантах, соответственно, составила $28,4 \pm 3,3\%$ и $55,6 \pm 4,9\%$, $p \leq 0,01$ (рис. 3).

Полученные данные показали, что транспортировка опухолевого материала при температуре +4°C в течение 24 часов с последующей неэнзиматической дезагре-

гацией является наиболее предпочтительной для выделения аутологичных КУК. Использование данного режима в работе с биоматериалом от больных РМП не приводит к значимому снижению жизнеспособности опухолевых клеток, не препятствует их дальнейшему адгезионному росту и пролиферации, что, в конечном итоге, позволяет получить КУК с жизнеспособностью от 75,8 до 87,8%.

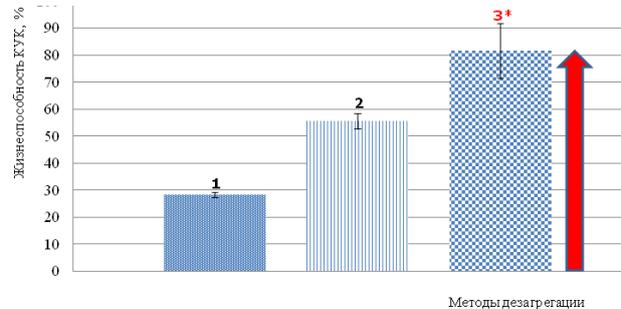


Рис. 3. Жизнеспособность клеток уротелиальной карциномы при различных методах дезагрегации опухолевого биоматериала
примечание: 1 – ферментативная дезагрегация I (трипсин); 2 - ферментативная дезагрегация II (коллагеназа); 3* – механическая дезагрегация

Изучение скорости пролиферации клеток в культуре показало, что она была различной и зависела от условий культивирования – питательной среды и концентрации ЭТС (рис. 4). В среде DMEM/F12 с L-глутамином и добавлением 5% ЭТС количество КУК на 3 сутки культивирования составило 20500 ± 4100 . При использовании RPMI-1640 с аналогичными добавками и 5% содержанием ЭТС количество КУК, выросших в лунках планшета, составило 19600 ± 4300 ($p > 0,05$). Отмечено, что с увеличением концентрации ЭТС в питательных средах количество КУК возрастало и составило для DMEM/F12 с L-глутамином/RPMI-1640 с L-глутамином соответственно: $22700 \pm 3900/21300 \pm 4100$ (10% ЭТС) и $25000 \pm 8100/24000 \pm 4300$ клеток (15% ЭТС).

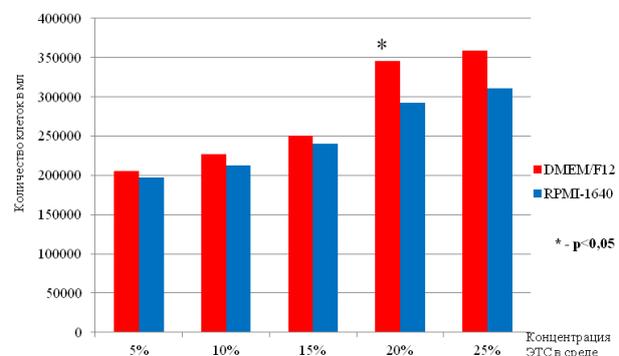


Рис. 4. Результат прироста КУК в зависимости от используемой питательной среды и концентрации ЭТС

При добавлении в среду 20% ЭТС выявлено достоверно значимое увеличение темпов прироста клеток.

Количество КУК составило 34600 ± 4200 для DMEM/F12 и 29200 ± 4200 для RPMI-1640 ($p < 0,05$). Дальнейшее повышение концентрации ЭТС до 25% не влияло на скорость пролиферации КУК, где их пролиферативная активность была на уровне 34900 ± 4400 при культивировании на среде DMEM/F12 и 31100 ± 3900 клеток - на среде RPMI-1640.

Основываясь на результатах предыдущего эксперимента, для дальнейшего изучения эффективности добавления других ростовых факторов и добавок на пролиферацию КУК в качестве ППС использовали питательную среду DMEM/F12 с L-глутамином и добавлением 20% ЭТС как наиболее соответствующую для обеспечения оптимального роста КУК. Для изучения скорости прироста клеток на 3 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 КУК без добавления ростовых добавок. Кроме того, в отдельные ячейки КУК высевали в селективную бессывороточную питательную среду для культивирования эпителиальных клеток человека Panser 628 (PAN-Biotech®, USA).

На рис. 5 представлены результаты прироста КУК в зависимости от используемых ростовых добавок.

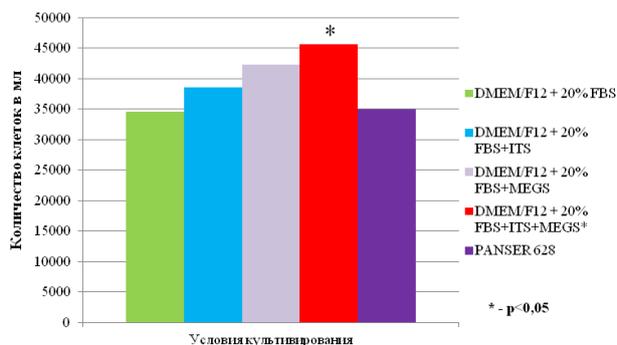


Рис. 5. Результаты прироста КУК в зависимости от добавления в ППС дополнительных ростовых факторов

Результаты проведенных экспериментов показали, что при добавлении к ППС одного из ростовых факторов - ITS или MEGS скорость пролиферации КУК на 3 сутки культивирования была выше в сравнении с контролем, либо культивированием клеток в бессывороточной среде Panser 628. Установлено, что на 3 сутки в лунках ППС+ITS количество клеток составило 38600 ± 3900 , а ППС+MEGS - 42300 ± 4100 . Добавление в питательную среду обоих ростовых добавок (ППС+ITS+MEGS) приводило к достоверно значимому увеличению скорости пролиферации КУК - 45600 ± 4200 ($p < 0,05$). В контрольных ячейках планшета (культивирование в ППС без добавления других ростовых факторов) коли-

чество клеток, полученных на 3 сутки культивирования увеличилось до 34600 ± 4200 . Применение селективной бессывороточной питательной среды для культивирования эпителиальных клеток человека Panser 628 по своей эффективности было сопоставимо с контролем (культивированием КУК на ППС). Количество клеток в ячейках планшета с данной средой составило 35000 ± 4300 .

Исследование эффективности различных способов криоконсервации проводили на 21 образце КУК. В результате проведенных исследований (рис. 6) установлены различия в жизнеспособности клеток, замороженных методом быстрой заморозки (рутинный метод) и методом постепенного снижения температуры с помощью программного замораживателя Mr. Frosty™ Freezing Container (Thermo Scientific™, USA).

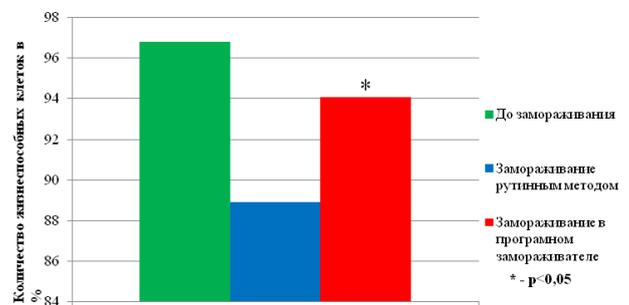


Рис. 6. Жизнеспособность КУК в зависимости от условий криоконсервации

Следует отметить, что количество жизнеспособных клеток в образцах КУК перед заморозкой составило $96,8 \pm 1,9\%$. При использовании рутинного метода количество жизнеспособных КУК было достоверно ниже ($88,9 \pm 3,4\%$) в сравнении с методом, где использовали программный замораживатель - $94,1 \pm 2,2\%$, $p < 0,05$.

В результате проведения комплексного изучения особенностей культивирования КУК, их оптимизации, верификации клеток опухолевых культур РМП получены и подготовлены к депонированию две опухолевые линии со стабильной экспрессией раковотестикулярных антигенов (РТА) на 50-м и 47-м пассажах, соответственно:

- образец мышечно-неинвазивной уротелиальной карциномы T1N0M0, high grade, взятый в ходе трансуретральной резекции от пациента Т. с диагнозом папиллярный уротелиальный РМП high grade с инвазией в подслизистый слой;
- образец мышечно-инвазивной уротелиальной карциномы T2N0M0, high grade, полученный при радикальной лапароскопической цистэктомии с расширенной тазовой лимфаденэктомией от пациента Р. с диагнозом уротелиальный папиллярный РМП high grade, врастающий в поверхностный слой мышечной оболочки стенки мочевого пузыря.

Выводы

1. Отработаны оптимальные условия для сохранения жизнеспособности аутологичных КУК в процессе их культивирования с целью создания ПДПВ против РМП.
2. Установлены параметры транспортировки и хранения биоматериала от больных РМП, нуждающихся в проведении иммунотерапии ПДПВ из отдаленных медицинских учреждений.
3. Определены оптимальные условия дезагрегации биоматериала, обеспечивающие высокую жизнеспособность КУК.
4. Подобраны оптимальные питательные среды и ростовые добавки для КУК. Оптимальной ППС для культивирования КУК является DMEM/F12 с L-глутамином с добавлением 20% ЭТС в конечной концентрации, что обеспечивает максимальный прирост опухолевых клеток на 3 день культивирования в CO² инкубаторе. Добавление к ППС (DMEM/F12 с L-глутамином с добавлением 20% ЭТС) комбинации ростовых факторов (ITS+MEGS) способствует максимальной пролиферации опухолевых клеток и является достоверно наиболее эффективной ($p < 0,05$) в сравнении с их отдельным применением в качестве ростовых добавок.
5. Установлено, что селективная бессывороточная ППС для культивирования эпителиальных клеток человека Panser 628 при культивировании КУК обеспечивает сопоставимый с сывороточной ППС (DMEM/F12 с L-глутамином с добавлением 20% ЭТС) прирост клеточной массы. Скорость пролиферации опухолевых клеток РМП на обеих ППС одинаковая ($p < 0,05$). Это свидетельствует о возможности успешной замены сывороточной ППС на селективную бессывороточную ППС Panser 628, что наиболее предпочтительно для клинического использования.
6. Использование программного замораживателя со скоростью охлаждения 1°C в минуту является оптимальным для поддержания жизнеспособности КУК и может быть рекомендовано для длительного хранения опухолевых клеток, предназначенных для приготовления аутологичных противоопухолевых вакцин.
7. В результате проведенной работы для депонирования подготовлены две верифицированные опухолевые линии РМП с мышечно-инвазивной и мышечно-неинвазивной уротелиальной карциномой, экспрессирующие РТА.
8. Применение аллогенных клеточных культур, характеризующихся постоянством цитогенетических изменений и стабильной экспрессией опухолеассоциированных антигенов, перспективно для создания аллогенных противоопухолевых вакцин для иммунотерапии и их использования в научно-исследовательских целях при РМП.

Примечание:

Работа выполнена в рамках диссертационного исследования, запланированного на кафедре аллергологии и иммунологии ФПК МР Медицинского института ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы на-

родов» (РУДН), и Договора о сотрудничестве между АНО «Институт иммунофизиологии» и ФГБУ «Научно-исследовательский институт онкологии имени Н. Н. Петрова МЗ РФ».

ЛИТЕРАТУРА

1. Дюкалова М.Б. Противоопухолевые вакцины на основе опухолевых клеток и их производных. Российский биотерапевтический журнал. 2012; 11(4):3-8.
2. Киселев В.И., Северин Е.С., Пальцев М.А. Противоопухолевые вакцины. Белки теплового шока как индукторы противоопухолевого иммунитета. Молекулярная медицина. 2005; 1: 310.
3. Колесник Е.А., Потеня Г.П., Кикоть В.А., Черный В.А., Лисовенко Г.С., Семерников В.А. Противоопухолевая аутовакцина в лечении больных распространенным колоректальным раком. Онкология. 1999; 2:104-8.
4. Косовский Г.Ю., Славянская Т.А. Оценка эффективности комбинированной лимфотропной иммунотерапии у больных внегоспитальной пневмонией на фоне базисной антибактериальной терапии. Аллергология и иммунология. 2003; 4(2): 51-3.
5. Михайлова И.Н., Демидов Л.В., Барышников А.Ю., Бурова О.С., Харкевич Г.Ю., Палкина Т.Н., и др. Клинические испытания аутологичной вакцины на основе опухолевых клеток, модифицированных геном tag-7. Сибирский онкологический журнал. 2005; 1:23-7.
6. Моисеенко В.М. Возможности вакцинотерапии меланомы кожи. Практическая онкология. 2001; 4:58-64.
7. Молчанов О.Е., Карелин М.И., Жаринов Г.М. Современные тенденции применения препаратов рекомбинантного интерлейкина2 в онкологии. Цитокины и воспаление. 2002; 1(3):3847.
8. Сальникова С.В., Славянская Т.А., Авдонкина Н.А. Современные подходы и достижения в лечении рака мочевого пузыря. Аллергология и иммунология. 2016; 17(1): 50-1.
9. Сальникова С.В., Славянская Т.А., Балдуева И.А., Авдонкина Н.А. Инновационные технологии в лечении рака мочевого пузыря. Аллергология и иммунология. 2016; 17(1): 21-6.
10. Сепиашвили Р.И., Балмасова И.П. Иммунные синапсы: от теории к клинической практике. Молекулярная медицина. 2008; 1:14-22.
11. Сепиашвили Р.И., Балмасова И.П., Славянская Т.А. Современная концепция иммунореабилитации. Int J Immunoreh. 1997; 6: 5.
12. Славянская Т.А., Авдонкина Н.А., Сальникова С.В. Оптимизация условий получения жизнеспособной первичной культуры клеток уротелиальной карциномы. Аллергология и иммунология. 2016; 17(3): 176-79.
13. 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; 10(2): 498-500.

14. Славянская Т.А., Сальникова С.В. Иммунологические критерии и маркеры для диагностики и прогнозирования рака мочевого пузыря. *Int J Immunoreh.* 2009; 11(1): 24.
15. 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; 17(2): 153.
16. Славянская Т.А., Сепиашвили Р.И. Роль цитокинов в иммунопатологии. *Аллергология и иммунология.* 2004; 5(1): 42.
17. Славянская Т.А., Сепиашвили Р.И. Роль цитокинов в иммунопатологии. *Аллергология и иммунология.* 2005; 6(2):42.
18. Славянская Т.А., Сепиашвили Р.И., Вишняков М.И., Чихладзе М.В. Иммунологический мониторинг больных хроническим бронхитом в динамике восстановительной иммунореабилитации. *Int J Immunoreh.* 1999; (11):70.
19. 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; 81(2):30-5.
20. Титов К.С., Демидов Л.В., Шубина И.Ж., Хайленко В.А., Киселевский М.В., Вихрова А.С. Технологии клеточной иммунотерапии в лечении больных со злокачественными новообразованиями. *Вестник РГМУ.* январь-март 2014; 1:42-7.
21. Чкадуа Г. З., Заботина Т. Н., Буркова А. А., Тамаева З. Э., Огородникова Е. В., Жордания К. И., и др. Адаптивное культивирование дендритных клеток человека из моноцитов периферической крови для клинического применения. *Российский биотерапевтический журнал.* 2002; 3:56-62.
22. Ragai R.M., Robin D.H. *Human Cell Culture Protocols. Methods in Molecular Biology.* 2012: 7651: 31-43.
23. 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. *Int J Immunoreh.* 2016; 18(1): 56.

SUMMARY

THE MAIN STAGES OF THE PREPARATION OF VIABLE TUMOR CELLS OF BLADDER CANCER: FROM ISOLATION OF THE TUMOR MATERIAL TILL CRYOPRESERVATION OF CELL LINES

^{1,2}Slavyanskaya T., ^{1,3}Salnikova S.

¹ People's Friendship University of Russia (RUDN University); ² Institute of Immunophysiology; ³ FSBI Clinical Hospital №1 of the Presidential Affairs Management of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation

The development of personalized autologous dendritic cell anti-tumor vaccines (PDPW) against bladder cancer (BC) is a relevant issue that covers many aspects required for its standardization. The article presents personal experimental studies related to development of optimal conditions of transportation of biological material; temperature and temporary modes for the storage of the samples; the materials about the optimal method of disaggregation of the biomaterial; there has been shown a comparative

analysis of different methods of tumor disaggregation; the selection of nutritious growth mediums and growth factors for urothelial carcinoma cells (UCC), the conditions of cryopreservation of tumor cells for maximum UCC viability, potentially suitable for creating PDPW against BC.

Keywords: bladder cancer, primary culture, anti-tumor vaccines, immunotherapy, urothelial carcinoma, cell viability, nutritious growth mediums, growth factors, cryopreservation.

РЕЗЮМЕ

ОСНОВНЫЕ ЭТАПЫ ПРИГОТОВЛЕНИЯ ЖИЗНЕСПОСОБНЫХ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК РАКА МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ: ОТ ВЫДЕЛЕНИЯ ОПУХОЛЕВОГО МАТЕРИАЛА ДО КРИОКОНСЕРВАЦИИ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ

^{1,2}Славянская Т.А., ^{1,3}Сальникова С.В.

¹Российский университет дружбы народов; ²Институт иммунофизиологии; ³ФГБУ Клиническая больница №1 Управления делами Президента РФ, Москва, Россия

Разработка персонифицированных аутологических дендритноклеточных противоопухолевых вакцин (ПДПВ) против рака мочевого пузыря (РМП) является актуальной проблемой, которая охватывает множество аспектов, необходимых для ее стандарти-

зации. В статье представлены данные собственных экспериментальных исследований по разработке оптимальных условий транспортировки биоматериала; температурном и временном режимах хранения образцов; результаты по оптимальному методу деза-

გრეგაციის ბიომатერიალი; продемонстрирован сравнительный анализ различных методов дезагрегации опухоли и материал по подбору питательных сред и ростовых факторов, условий криоконсервации ауто-

логических клеток уротелиальной карциномы (КУК), обеспечивающих максимальную жизнеспособность КУК, потенциально пригодных для создания ПДПВ против РМП.

რეზიუმე

შარდის ბუშტის კიბოს სიცოცხლისუნარიანი სიმსივნური უჯრედების მომზადების ძირითადი ეტაპები: სიმსივნური მასალის გამოყოფიდან უჯრედული ხაზების კრიოკონსერვაციამდე

^{1,2}გ. სლავიანსკაია, ^{1,3}ს. სალნიკოვა

¹რუსეთის ხალხთა მეგობრობის უნივერსიტეტი; ²იმუნოფიზიოლოგიის ინსტიტუტი;
³რუსეთის ფედერაციის პრეზიდენტის ადმინისტრაციის ფედერალური სახელმწიფო საბიუჯეტო დაწესებულება №1, კლინიკური საავადმყოფო, მოსკოვი, რუსეთი

პერსონიფიცირებული აუტოლოგიური დენდრიტულ-უჯრედული სიმსივნის საწინააღმდეგო ვაქცინის შემუშავება შარდის ბუშტის კიბოს დროს აქტუალური პრობლემაა, რომელიც მისი სტანდარტიზაციისათვის აუცილებელ მრავალ ასპექტს მოიცავს.

სტატიაში წარმოდგენილია საკუთარი ექსპერიმენტული კვლევების მონაცემები ბიომასალის ტრანსპორტირების, ნიმუშების შენახვის ტემპერატურული და დროითი რეჟიმების, ბიომასალის დეზაგრეგაციის ოპტიმალური მეთოდის

შემუშავების თვალსაზრისით. მოცემულია: სიმსივნის დეზაგრეგაციის სხვადასხვა მეთოდის შედარებითი ანალიზი, მონაცემები კვების და ზრდის ფაქტორების შერჩევის, ასევე, უროთელური კარცინომის აუტოლოგიური უჯრედების კრიოკონსერვაციის შესახებ, რაც უზრუნველყოფს შარდის ბუშტის კიბოს საწინააღმდეგო პერსონიფიცირებული დენდრიტულ უჯრედული ვაქცინის შექმნისათვის ვარგისი უროთელური კარცინომის უჯრედების მაქსიმალურ სიცოცხლისუნარიანობას.

КРИТЕРИИ ОТБОРА ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК И ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ИММУНОТЕРАПИИ ПРИ РАКЕ МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ

^{1,2}Славянская Т.А., ^{1,3}Сальникова С.В., ^{1,2}Сепиашвили Р.И.

¹Российский университет дружбы народов, Москва; ²Институт иммунофизиологии, Москва;
³ФГБУ Клиническая больница №1 Управления делами Президента РФ, Москва, Россия

В последнее десятилетие достигнуты несомненные успехи в лечении злокачественных опухолей, в первую очередь, вследствие прогресса лекарственной терапии, основанной на достижениях молекулярной биологии, иммунологии, понимании механизмов опухолевой прогрессии, взаимоотношения иммунной системы и опухоли, а также процессов, происходящих в опухолевом микроокружении. Это способствовало значительному расширению возможности применения имеющихся знаний в изучении иммунопатогенетических особенностей различных заболеваний [2,3,7,8,17-20], появлению новых научных медицинских направлений на стыке нескольких специальностей (включая иммуноонкологию) и возможности применения в клинической практике принципиально новых методов диагностики и лечения [4,5,9,11,13,14,33]. Иммунологические подходы в онко-

логии позволили изучать патогенетические механизмы развития опухоли, противоопухолевый иммунитет, ускорили поиск прогностических и диагностических маркеров, клеток-мишеней для таргетной терапии, определить новые подходы для решения терапевтических задач. Вместе с тем, внедрение инновационных биотехнологий ставит новые вопросы, решение которых представляется стратегически важным в развитии фундаментальных и клинических аспектов современной онкологии.

Наряду с общепринятыми методами лечения рака мочевого пузыря (РМП): хирургическим, лучевой и химиотерапией, иммунотерапия опухоли является современным и многообещающим направлением в онкологии. Неспецифические методы иммунотерапии с успехом

применяется уже более 40 лет для активации иммунной системы при лечении уротелиальной карциномы. Разработка метода специфической иммунотерапии при РМП представляет собой актуальную проблему.

Раковотестикулярные антигены (РТА), которые в норме присутствуют у взрослых людей только в яичке и плаценте, 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. Вместе с тем, высокий показатель мутационной нагрузки при РМП, уступающий только меланоме и раку легких, определяет чувствительность опухоли к иммунотерапевтическим методам воздействия и делает её одной из наиболее перспективных мишеней для иммунотерапии [1]. Ингибиторы контрольных точек, такие как CTLA-4, PD-1 и PD-L1, а также противоопухолевые вакцины, уже продемонстрировали свою активность при этих заболеваниях. Возможно, что именно значительное количество мутаций в опухоли, имеющей высокий уровень экспрессии опухолеассоциированных антигенов для их представления иммунной системе, является важным фактором эффективности иммунопрепаратов.

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 сильно варьирует в зависимости от типа опухоли. Для меланомы, рака яичников, рака легких и РМП характерна высокая экспрессия РТА, тогда как для колоректального рака и рака простаты – низкая [24]. По уровню мутационной нагрузки уротелиальная карцинома занимает третье место среди всех злокачественных новообразований, уступая в этом отношении только меланоме и раку легких, что определяет перспективу использования иммунотерапии при РМП [21,23,26,29,32,35]. В ряде исследований были продемонстрированы высокие уровни экспрессии РТА клетками РМП [24,28]. Так, в когортных исследованиях [24], проведенных на 350 больных РМП, изучен комплекс РТА: NY-ESO-1, MAGE-A3, LAGE-1 и PRAME для определения их прогностической значимости. Показано, что экспрессия генов РТА достоверно связана как со стадией заболевания, так и степенью проникновения опухоли. Так, экспрессия генов MAGE-A3 составила 43%, NY-ESO-1 - 35%, LAGE-1 – 27% и PRAME – 20%. Наличие экспрессии генов MAGE-A3 у больных РМП определяли чаще, чем другие РТА, и она, по мнению авторов, была ассоциирована с более агрессивными типами опухоли. Экспрессия гена LAGE-1 была характерна для мышечно-неинвазивной формы (МНФ) РМП с тенденцией к опухолевой прогрессии. Экспрессия гена PRAME указывала на плохой ответ на химиотерапию. MAGE-A3 и LAGE-1 были ассо-

циированы с коротким безрецидивным периодом. Это создает предпосылки для разработки новых подходов и новых мишеней в лечении больных злокачественными новообразованиями, использовании инновационных методов и способов лечения, технологий, которые могут обеспечить успех современной системной терапии. Хотя высокая иммуногенность уротелиальной карциномы доказана, подобные исследования в пределах данной нозологии являются единичными.

Создание персонифицированных дендритноклеточных противоопухолевых вакцин (ПДПВ) для лечения РМП 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. Эта проблема также охватывает множество аспектов, необходимых для ее стандартизации. В частности, при культивировании опухолевых клеток в условиях *in vitro* их трансформация идет более быстрыми темпами по сравнению с развитием опухоли *in vivo*, что необходимо учитывать при выборе клеточных линий для исследований.

По данным литературы [26], в опухолях мочевого пузыря отмечены разнообразные изменения в 9 хромосоме, особенно в локусе 21p, моносомия по хромосомам 1, 3, 6, 8, 13, 14 и 17, потеря хромосомы Y. В FISH исследованиях с помощью центромерных зондов специфические мутации 9 хромосомы обнаружены в 44-60% случаев. Подобные хромосомные нарушения соответствуют самым ранним стадиям развития уротелиальной опухоли и не связаны с ее прогрессированием. Именно в локусе 21p 9 хромосомы находится кластер генов-супрессоров опухолевого роста p14(ARF), p15 и p16 (MTS1, CDKN2), который кодирует белок, ингибирующий циклин-зависимые киназы 4. Другую большую группу составляют изменения 17 хромосомы, в которой закодирован ген-супрессор опухолевого роста p53. Эти изменения составляют около 42% и коррелируют как со степенью злокачественности, так и со стадией опухолевого процесса. Делецию 17p часто определяют при мышечно-инвазивном раке. По некоторым данным, эта мутация связана с неблагоприятным прогнозом течения заболевания, ранним прогрессированием и метастазированием опухоли. Также для мышечно-инвазивных опухолей характерны мутации короткого плеча 13 хромосомы (27% случаев), где находится ген RB.

Вышеизложенное определяет несомненную актуальность проведения исследований по разработке критериев отбора опухолевых клеток при РМП, пригодных для приготовления на их основе аутологичных дендритноклеточных вакцин. Это позволит не только восполнить имеющийся пробел в научных исследованиях, но и, в дальнейшем, получить принципиально новое средство для лечения уротелиальной карциномы.

Целью данного исследования явилось изучение уровня экспрессии раковотестикулярных антигенов (MAGE, NY-ESO-1, GAGE и BAGE) клетками уротелиальной карциномы на разных пассажах, молекулярно-генетических особенностей опухолевых культур рака мочевого пузыря при длительном культивировании, а также получение верифицированных культур клеточной линии мышечно-инвазивной и мышечно-неинвазивной уротелиальной карциномы, потенциально пригодных для создания опухолеассоциированных вакцин против рака мочевого пузыря.

Материал и методы. В работе использованы образцы опухоли от 54 больных в возрасте от 37 до 82 лет с мышечно-инвазивной формой (МИФ) и МНФ РМП, выделенные непосредственно после проведения хирургического вмешательства. Подробную информацию о каждом пациенте и характеристику его опухоли получали из истории болезни. От всех пациентов получено письменное добровольное согласие. Полученные в ходе операции фрагменты опухолевой ткани размером не менее 0,3 см³ немедленно помещали в стерильные контейнеры с питательной средой (ПС) DMEM/F12 (Биолот, Россия) и доставляли в лабораторию. Для дезагрегации клеток применяли автоматический механический метод с помощью Медимашин (DAKO, Дания). Полученную клеточную суспензию последовательно пропускали через стерильные нейлоновые фильтры с диаметром пор 100 и 70 мкм (DAKO, Дания). Жизнеспособность оценивали на автоматическом счетчике Countess (Invitrogen, USA) методом подсчета клеток, окрашенных трипановым синим. Клетки суспендировали в полной питательной среде (ППС) следующего состава: DMEM/F12 (Биолот, Россия) с добавлением 20% фетальной бычьей сыворотки (Биолот, Россия) и ростовых факторов: инсулин, трансферрин, селен (Invitrogen, USA). Культивирование клеток уротелиальной карциномы (КУК) осуществляли в CO² инкубаторе «Heracel» (Termo Electron LTD GmbH, Германия). Пассирование проводили с использованием смеси равных объемов растворов Версена (Биолот, Россия) и Трипсина (Биолот, Россия) [26]. В своей работе руководствовались ранее описанными в литературе методами [22,25]. 10 стабильно перевиваемых опухолевых культур исследовали на ранних (до 10-го) и более поздних (свыше 30-го) пассажах. За 24 часа до сбора метафазных хромосом в культуральные флаконы добавляли колхицин в конечной концентрации 0.04 мкг/мл. Затем, спустя 24 часа, флакон с монослоем клеток помещали на 1 минуту в кювету со льдом, после чего, интенсивным покачиванием флакона, отделяли метафазные клетки от поверхности и сливали полученную суспензию в пробирки для центрифугирования. После осаждения клеток центрифугированием в течение 10 минут при 1000 об./мин. к осадку добавляли гипотонический раствор (0.075 М KCl), ресуспендировали и экспонировали 35-45 мин. при t=37°C. Затем клетки осаждали

центрифугированием в течение 10 мин. при 1000 об./мин., супернатант удаляли и при осторожном помешивании к осадку по каплям добавляли охлажденный фиксатор - метанол-уксусную кислоту в соотношении 3:1. Последнюю процедуру повторяли трижды. После чего клетки раскапывали на охлажденные влажные стекла и 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 [27].

Ранее нами были кратко описаны особенности культивирования КУК [10,16], а также некоторые аспекты по данной проблеме [6,12,15,30,31,34].

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 (SPSS, Chicago, IL, USA).

Результаты и их обсуждение. От 54 больных с разными формами инвазии РМП получено 10 стабильно перевиваемых КУК, которые изучали на наличие экспрессии РТА на ранних (до 10-ти) и более поздних (свыше 30-ти) пассажах. Из проанализированных 10 образцов - 6 были представлены МИФ РМП и 4 МНФ РМП.

Результаты сравнительных исследований показали, что в культурах КУК 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 (рис. 1).

Установлено, что экспрессия РТА в образцах была неоднородной. При длительном культивировании КУК (более 30-и пассажей) отмечали достоверное снижение процентного содержания клеток, экспрессирующих РТА - 28.2±4.6%, вплоть до полного исчезновения (p<0,05). Так, при цитофлуориметрическом исследо-

вании образцов опухолевых КУК пациента Т. с МФФ опухоли высокой степени злокачественности (T1N0M0/GIII) на 5-м и 30-м пассажах (рис. 2, 3) установлено, что экспрессия РТА группы MAGE на 5-м пассаже составляла 78,6% в сравнении с 39,8% MAGE - позитивных клеток, выявленных на 30-м пассаже ($p < 0,05$).

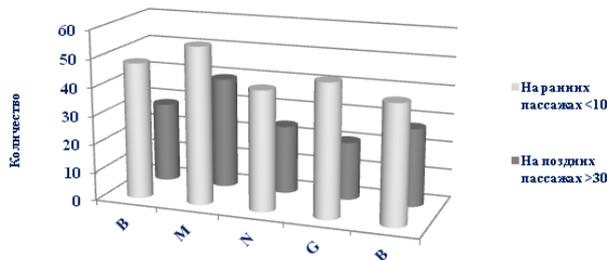


Рис. 1. Количество РТА-позитивных клеток в культурах опухолевых клеток больных РМП

Суммарное количество КУК, экспрессирующих РТА, в одном образце на ранних пассажах, в среднем, составляло 48%, в то время как экспрессия РТА у

КУК, 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 среднем, 42,3%, на поздних пассажах эта цифра была значительно ниже - 24,1% ($p < 0,05$). Клетки, экспрессирующие GAGE и BAGE, обнаруживались 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% ($p < 0,05$). Причем опухолевые клетки от больных МИФ РМП показали более стабильные результаты не только при культивировании, но и при определении экспрессии РТА ($p \leq 0,05$). Отмечено, что КУК от этих больных сохраняли более длительную экспрессию РТА при более длительных пассажах. Только одна культура не экспрессировала РТА. В то время как КУК от пациентов с МФФ РМП практически не экспрессировали РТА, либо теряли такую способность в процессе культивирования.

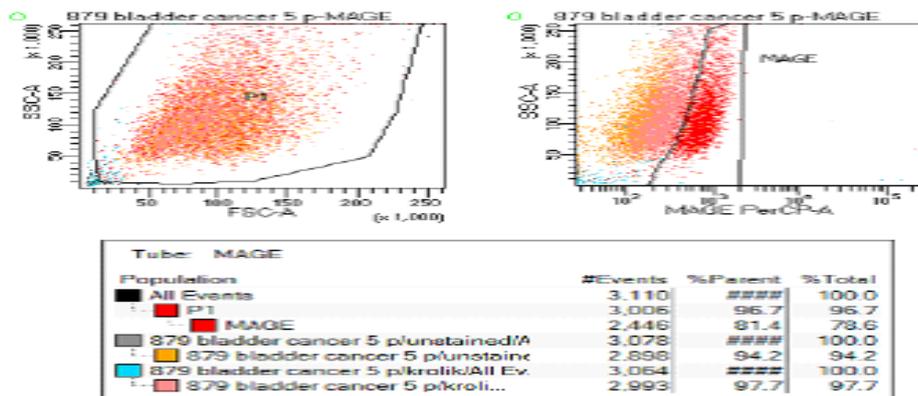


Рис. 2. Результаты экспрессии РТА группы MAGE опухолевыми клетками уротелиальной карциномы пациента Т., 61 года с МФФ опухоли высокой степени злокачественности (T1N0M0/GIII) на 5-м пассаже

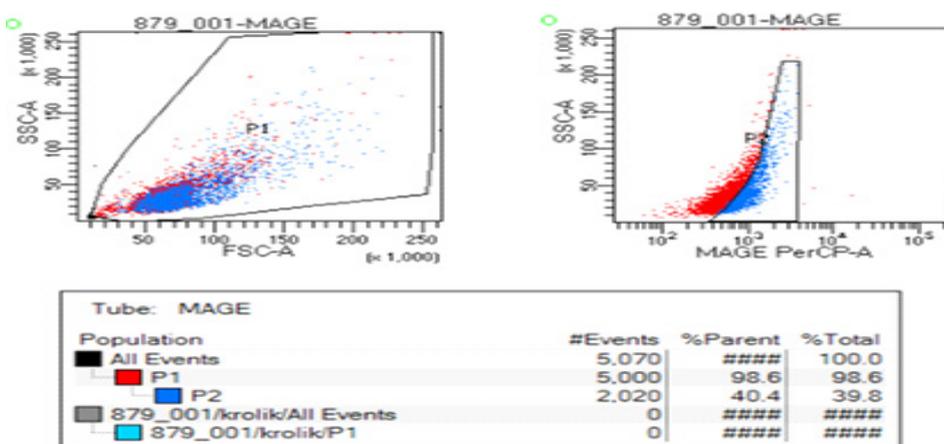


Рис. 3. Результаты экспрессии РТА группы MAGE опухолевыми клетками уротелиальной карциномы пациента Т., 61 года с МФФ опухоли высокой степени злокачественности (T1N0M0/GIII) на 30-м пассаже

В проведенных исследованиях установлено, что все исследуемые опухолевые культуры имели характерные для РМП 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. Можно предположить, что трансформация опухолевых клеток в культуре *in vitro* идет еще более быстрыми темпами по сравнению с ее развитием *in vivo*.

При молекулярно-генетическом анализе культуры клеток уротелиальной низкодифференцированной карциномы высокого злокачественного потенциала (T1N0M0 high grade) пациента Т. (61 год), исследованной на 9 пассаже (рис. 4а), 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 (рис. 4б) отмечали более значительные изменения кариотипа клеток опухолевой культуры: увеличение количества хромосомных мутаций и моносомию по 15, 16, 17, 19 хромосомам.

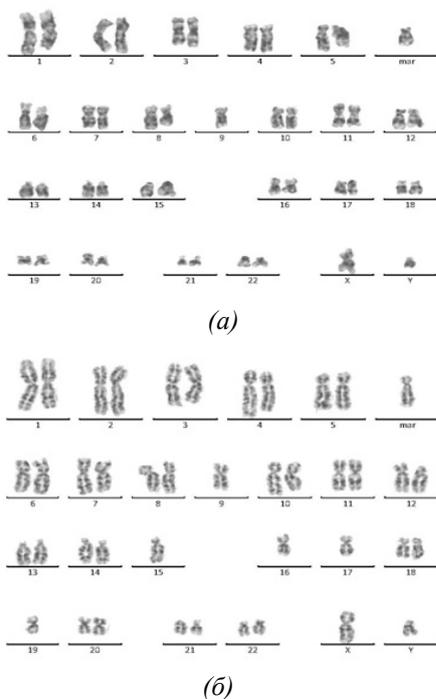


Рис. 4. Цитогенетический профиль культуры клеток уротелиальной карциномы (T1N0M0 high grade) на 9-м пассаже (а) с кариотипом: 46, XY, -9, +mar и 34-м пассаже (б) с кариотипом: 42, XY, -9, -15, -16, -17, -19, +mar

Наибольшее число хромосомных изменений было выявлено на поздних пассажах. При кариотипировании клеток уротелиальной низкодифференцированной карциномы 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)x2, +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 (рис. 5).

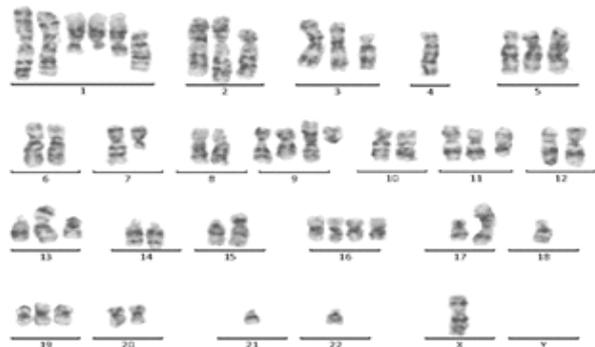


Рис. 5. Цитогенетический профиль культуры клеток уротелиальной карциномы (T2N0M0 high grade) на 36-м пассаже с кариотипом: 53-55, X, -Y, t(1;7), +del(1)(q22)x2, +del(1)(q21), +del(1)(p22), +del(2)(p13), +del(3)(p), 4, +5, del(7)(q11.2), t(7;12)(p;q), +t(9;12), +del(11)(q), 12q⁺, +t(12;17), t(13;17)(q;p), 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 (рис. 6).

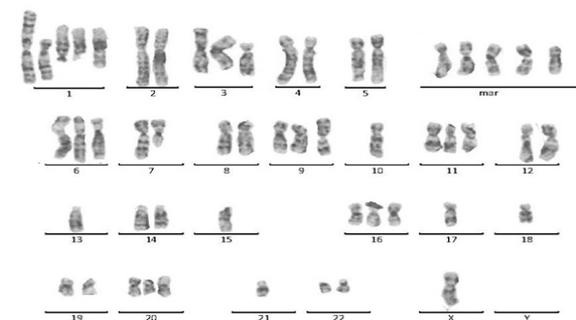


Рис. 6. Цитогенетический профиль культуры клеток уротелиальной карциномы (T2N0M0 high grade) на 38-м пассаже с кариотипом: 53, X-Y, i(1q), +del(1)(p22), del(1)(q12), del(1)q11, del(1)(q23), del(3)(p11), +der(6), del(7)(q12), +t(9;12), -10, del(11)(p13), der(11), -13, -15, +16, -17, 18, +20, -21

Таблица. Цитогенетический профиль образцов опухолевой культуры РМП и экспрессия РТА в зависимости от длительности культивирования

N	Age	Stage/ Grade	Экспрессия РТА на ранних пассажах (<10)				Экспрессия РТА на поздних пассажах (>30)			
			NY-ESO	GAGE	MAGE	BAGE	NY-ESO	GAGE	MAGE	BAGE
1.	61	T1/GIII	+	+	+	+	+	+	+	+
2.	68	T2/GIII	+	+	+	+	+	+	+	+
3.	71	T2/GIII	+	-	+	-	+	-	-	-
4.	69	T3a/GIII	-	+	+	-	-	+	-	-
5.	45	T1/GI	-	-	+	+	-	-	+	-
6.	74	T2/GII	+	+	+	-	-	+	-	-
7.	73	T2/GIII	+	-	+	-	-	-	+	-
8.	56	T1/GIII	-	-	-	-	-	-	-	-
9.	66	T1/GI	-	-	-	-	-	-	-	-
10.	70	T2/GIII	-	-	-	-	-	-	-	-

При сопоставлении результатов с данными, полученными методом проточной цитометрии, обнаружена достоверная корреляция этих изменений со снижением экспрессии РТА (GAGE, BAGE, MAGE и NY-ESO-1) ($p < 0,05$). При этом отдельные культуры сохраняли как цитогенетический профиль, так и стабильную экспрессию РТА при многократных пассажах (таблица), что делает их перспективными для дальнейшего использования в иммунотерапии при РМП.

В результате проведения комплексного изучения особенностей культивирования КУК, их оптимизации, верификации клеток опухолевых культур РМП с проведением молекулярно-генетического анализа кариотипа опухолевых клеток и экспрессии РТА на их поверхности, были получены и подготовлены к депонированию две верифицированные опухолевые линии со стабильной экспрессией РТА на 50-м и 47-м пассажах, соответственно:

а) образец мышечно-неинвазивной уротелиальной карциномы T1N0M0, high grade, взятый в ходе трансуретральной резекции от пациента Т. с диагнозом папиллярный уротелиальный РМП high grade с инвазией в подслизистый слой;

б) образец мышечно-инвазивной уротелиальной карциномы T2N0M0, high grade, полученный при радикальной лапароскопической цистэктомии с расширенной тазовой лимфаденэктомией от пациента Р. с диагнозом уротелиальный папиллярный РМП high grade, врастающий в поверхностный слой мышечной оболочки стенки мочевого пузыря.

Выводы

1. В процессе культивирования клеток РМП выявлено, что для создания аутологических ПДПВ необходимо оценивать уровень экспрессии РТА и использовать аутологичные опухолевые клетки на ранних пассажах (не позднее десятого). КУК с высокой частотой экспрес-

сии РТА могут быть использованы для приготовления аутологичных дендритноклеточных вакцин. В МНФ РМП экспрессия РТА существенно ниже, чем при МИФ РМП, но не отсутствует полностью.

2. В результате проведенной работы для депонирования подготовлены две верифицированные опухолевые линии РМП с мышечно-инвазивной и мышечно-неинвазивной уротелиальной карциномой, экспрессирующие РТА.

3. Применение аллогенных клеточных культур, характеризующихся постоянством цитогенетических изменений и стабильной экспрессией опухолеассоциированных антигенов, перспективно для создания аллогенных противоопухолевых вакцин для иммунотерапии и их использования в научно-исследовательских целях при РМП.

Примечание:

Работа выполнена в рамках диссертационного исследования, запланированного на кафедре аллергологии и иммунологии ФПК МР Медицинского института ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» (РУДН), и Договора о сотрудничестве между АНО «Институт иммунофизиологии» и ФГБУ «Научно-исследовательский институт онкологии имени Н.Н. Петрова МЗ РФ».

ЛИТЕРАТУРА

1. Дюкалова М.Б. Противоопухолевые вакцины на основе опухолевых клеток и их производных. Российский биотерапевтический журнал. 2012; 11(4): 3-8.
2. Косовский Г.Ю., Славянская Т.А. Оценка эффективности комбинированной лимфотропной иммунотерапии у больных внегоспитальной пневмонией на фоне базисной антибактериальной терапии. Аллергология и иммунология. 2003; 4(2): 51-3.
3. Немцова М.В., Кушлинский Н.Е. Молекулярный патогенез рака мочевого пузыря. Альманах клинической медицины. 2015; 41: 79-88.

4. Сальникова С.В., Славянская Т.А., Авдонкина Н.А. Современные подходы и достижения в лечении рака мочевого пузыря. *Аллергология и иммунология*. 2016; 17(1): 50-1.
5. Сальникова С.В., Славянская Т.А., Балдуева И.А., Авдонкина Н.А. Инновационные технологии в лечении рака мочевого пузыря. *Аллергология и иммунология*. 2016; 17(1): 21-6.
6. Сальникова С.В., Славянская Т.А. Сравнительная характеристика уровня экспрессии опухолеассоциированных антигенов при различных формах инвазии рака мочевого пузыря. *Аллергология и иммунология*. 2016; 17(4): 258.
7. Сепиашвили Р.И., Балмасова И.П. Имунные синапсы: от теории к клинической практике. *Молекулярная медицина*. 2008; 1: 14-22.
8. Сепиашвили Р.И., Балмасова И.П., Славянская Т.А. Современная концепция иммунореабилитации. *Int J Immunoreh*. 1997; 6: 5.
9. Сепиашвили Р.И., Беляев А.М. Иммунотерапия рака: проблемы и перспективы. *Аллергология и иммунология*. 2015; 16 (4): 354-7.
10. Славянская Т.А., Авдонкина Н.А., Сальникова С.В. Оптимизация условий получения жизнеспособной первичной культуры клеток уротелиальной карциномы. *Аллергология и иммунология*. 2016; 17(3): 176-9.
11. 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; 10(2): 498-500.
12. Славянская Т.А., Сальникова С.В. Анализ экспрессии раково-тестикулярных антигенов на клетках опухолевых культур рака мочевого пузыря. *Аллергология и иммунология*. 2016; 17(4): 257.
13. Славянская Т.А., Сальникова С.В. Иммунологические критерии и маркеры для диагностики и прогнозирования рака мочевого пузыря. *Int J Immunoreh*. 2009; 11(1): 24.
14. 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; 17(2): 153.
15. Славянская Т.А., Сальникова С.В., Сепиашвили Р.И. Хромосомные aberrации и экспрессия опухолеассоциированных антигенов опухолевыми культурами рака мочевого пузыря при длительном культивировании. *Аллергология и иммунология*. 2016; 17(4): 257-8.
16. Славянская Т.А., Авдонкина Н.А., Сальникова С.В. Оптимизация условий получения жизнеспособной первичной культуры клеток уротелиальной карциномы. *Аллергология и иммунология*. 2016; 17(3): 176-9.
17. Славянская Т.А., Сепиашвили Р.И. Роль цитокинов в иммунопатологии. *Аллергология и иммунология*. 2004; 5(1): 42.
18. Славянская Т.А., Сепиашвили Р.И. Роль цитокинов в иммунопатологии. *Аллергология и иммунология*. 2005; 6(2):42.
19. Славянская Т.А., Сепиашвили Р.И., Вишняков М.И., Чихладзе М.В. Иммунологический мониторинг больных хроническим бронхитом в динамике восстановительной иммунореабилитации. *Int J Immunoreh*. 1999; (11):70.
20. 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; 81(2):30-5.
21. Alexandrov L.B., Nik-Zainal S., Wedge D.C., Aparicio S.A., Behjati S., et al. Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature*. 2013; 500: 415-21.
22. Cheryl D.H., Cindy L.M. *Basic Cell Culture Protocols. Methods in Molecular Biology*. 2013; 946: 363-95.
23. Cordon-Cardo C., Dalbagni G., Saez G. T., Oliva M. R., Zhang Z. F., et al. Human cancer. p53 mutations in human bladder cancer: Genotypic versus phenotypic patterns. *Int. J. Cancer*. 2013; 56(3): 347-53.
24. Dyrskjot, L, Zieger, K, Lildal, T.K., Reinert, T., Gruselle, O., et al. Expression of MAGE-A3, NY-ESO-1, LAGE-1 and PRAME in urothelial carcinoma. *British J of Cancer*. 2012; 107: 116-22.
25. Freshney R.I. *Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications*. 6th ed. John Wiley & Sons, Inc. USA; 2013: 463-66.
26. Heim, S., Mitelman, F. *Cancer Cytogenetics: Chromosomal and Molecular Genetic Aberrations of Tumor Cells*. Wiley-Blackwell, England; 2015.
27. McGowan-Jordan, J., Simons, A., Schmid, M. *ISCN: an international system for human cytogenomic nomenclature*. Karger, Basel, New York; 2016.
28. Mengus, C., Schultz-Thater, E., Coulot, J., Kastelan, Z., Goluzza, E., et al. MAGE-A10 cancer/testis antigen is highly expressed in high-grade non-muscle-invasive bladder carcinomas. *Int. J. Cancer*. 2013; 132: 2459-63.
29. Ragai R.M., Robin D.H. *Human Cell Culture Protocols. Methods in Molecular Biology*. 2012: 7651: 31-43.
30. Salnikova 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 J Immunoreh*. 2016; 18 (2): 129.
31. Slavyanskaya T., Salnikova S. Analysis of expression of cancer-testicular antigens on the tumor cell cultures of bladder cancer. *Int J Immunoreh*. 2016; 18 (2):128.
32. 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. *Int J Immunoreh*. 2016; 18(1): 56.
33. Slavyanskaya T.A., Salnikova S.V. Immunologic criteria and markers for diagnostics and prognosis of urinary bladder cancer. *Int J Immunoreh*. 2009; 11 (2): 180.
34. 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. *Int J Immunoreh*. 2016; 18 (2): 128-9.

35. Zhang, X., Zhang, Y. Bladder Cancer and Genetic Mutations. *Cell Biochem Biophys*. 2015 Sep; 73(1): 65-9.

SUMMARY

CRITERIA FOR SELECTION OF TUMOR CELLS AND PROSPECTS FOR SPECIFIC IMMUNOTHERAPY FOR BLADDER CANCER

^{1,2}Slavyanskaya T., ^{1,3}Salnikova S., ^{1,2}Sepiashvili R.

¹People's Friendship University of Russia; ²Institute of Immunophysiology; ³FSBI Clinical Hospital №1 of the Presidential Affairs Management of the Russian Federation, Moscow, Russia

Specific antitumor immunotherapy with autologous dendritic cell vaccines is one of the new approaches of modern medicine. For activation of dendritic cells highly immunogenic antigens are used, however optimal antigens in case of bladder cancer (BC) are still not researched. Cancer-testis antigens (CTA) are the most promising target in the context of creation of antitumor vaccines, because they are distinguished by pronounced immunogenicity, they are detected in different types of tumors and have limited pattern of expression in healthy tissues of grown-up organism. Regarding the level of mutational load, bladder cancer (BC) holds the third position among all malignant growths, which creates particular opportunities for use of immunotherapy in case of this disease. At chromosomal level most times the following cytogenetic anomalies specific for BC are detected: hyperploidy at 3, 7 and 17 chromosomes and deletion of 9p 21 locus. Besides, in the literature there is information about possible monosomy at 2, 3, 6, 8, 13, 14, 17 and frequent loss of Y chromosome in case of BC. Development of personified dendritic cell antitumor vaccines (PDV) against bladder cancer (BC) is a relevant problem, which covers many aspects, necessary for its standardization. In particular, in case of cultivation of tumor cells under *in vitro* conditions their transformation goes at higher pace in comparison with *in vivo* tumor development. Moreover, the article presents the results of the study of molecular-genetic features of BC of tumor cultures in case of long-term cultivation, the level of expression of CTA (MAGE, NY-ESO-1, GAGE, BAGE) by urothelial carcinoma cells (UCC). There has been described the karyotypes of cells of urothelial low differentiated carcinoma of high malignant potential at various passages with prolonged cultivation, as well as the correlation between cytogenetic profile and expression of tumor-specific cancer-testis antigens has been identified. There have been developed two verified cell line cultures of muscle invasive and muscle-non-invasive urothelial carcinoma, that are potentially useful for the producing of tumor-associated vaccines against BC.

Keywords: urothelial carcinoma, cancer-testis antigens, anti-tumor vaccine, karyotype, cell line cultures.

РЕЗЮМЕ

КРИТЕРИИ ОТБОРА ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК И ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ИММУНОТЕРАПИИ ПРИ РАКЕ МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ

^{1,2}Славянская Т.А., ^{1,3}Сальникова С.В.,
^{1,2}Сепиашвили Р.И.

¹Российский университет дружбы народов, Москва; ²Институт иммунофизиологии, Москва; ³ФГБУ Клиническая больница №1 Управления делами Президента РФ, Москва, Россия

Специфическая противоопухолевая иммунотерапия аутологичными дендритноклеточными вакцинами является одним из новых направлений современной медицины. Для активации дендритных клеток используют высокоиммуногенные антигены, однако оптимальные антигены при раке мочевого пузыря (РМП) по сей день не изучены. Раково-тестикулярные 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. По уровню мутационной нагрузки РМП занимает третье место среди всех злокачественных новообразований, что создает определенные перспективы для использования иммунотерапии при этом заболевании. На хромосомном уровне чаще всего выявляются следующие, характерные для РМП, цитогенетические аномалии: гиперплоидии по 3, 7 и 17-й хромосомам и делеция 9p 21 локуса. Кроме того, в литературе имеются сведения о возможной моносомии по 2, 3, 6, 8, 13, 14, 17 и частой потере Y-хромосомы при РМП. Разработка персонифицированных дендритноклеточных противоопухолевых вакцин против РМП является актуальной проблемой, которая охватывает множество аспектов, необходимых для ее стандартизации. В частности, при культивировании опухолевых клеток в условиях *in vitro* их трансформация происходит более быстрыми темпами в сравнении с развитием опухоли *in vivo*. В работе представлены данные по изучению особенностей экспрессии РТА (MAGE, NY-ESO-1, GAGE, BAGE) опухолевыми клетками уротелиальной карциномы при длительном культивировании. Кроме того, представлены результаты изучения молекулярно-генетических особенностей опухолевых культур РМП при длительном культивировании, описаны кариотипы клеток уротелиальной низкодифференцированной карциномы высокого злокачественного потенциала на различных пассажах при длительном культивировании, выявлена взаимосвязь цитогенетического профиля с экспрессией опухолеспецифических

РТА. Подготовлены две верифицированные культуры клеточной линии мышечно-инвазивной и мышечно-неинвазивной уротелиальной карциномы, потенциально пригодные для создания опухолеассоциированных вакцин против РМП.

რეზიუმე

სიმსივნური უჯრედების შერჩევის კრიტერიუმები და სპეციფიკური იმუნოთერაპიის გამოყენების პერსპექტივა შარდის ბუშტის კიბოს დროს

^{1,2}გ. სლავეიანსკაია, ^{1,3}ს. სალნიკოვა,

^{1,2}რ. სეფიაშვილი

¹რუსეთის ხალხთა მეგობრობის უნივერსიტეტი, მოსკოვი; ²იმუნოფიზიოლოგიის ინსტიტუტი, მოსკოვი; ³რუსეთის ფედერაციის პრეზიდენტის საქმეთა სამმართველოს №1 კლინიკური საავადმყოფო, მოსკოვი, რუსეთის ფედერაცია

კიბოსსაწინააღმდეგო სპეციფიკური იმუნოთერაპია აუტოლოგიური დენდრიტულ უჯრედული ვაქცინებით თანამედროვე მედიცინის ერთ-ერთ ახალ მიმართულებას წარმოადგენს. დენდრიტული უჯრედების აქტივაციისათვის იყენებენ მაღალ-იმუნოგენურ ანტიგენებს, თუმცა შარდის ბუშტის კიბოს (შბკ) დროს ოპტიმალური ანტიგენები დღემდე არ არის შესწავლილი. სიმსივნურ-ტესტიკულური ანტიგენები (სტა) ყველაზე პერსპექტიულ სამიზნეს წარმოადგენენ

სიმსივნისსაწინააღმდეგო ვაქცინების შექმნის დროს, რადგანაც გამოირჩევიან გამოხატული იმუნოგენობით, განისაზღვრებიან სხვადასხვა ტიპის სიმსივნის დროს და აქვთ ექსპრესიის შეზღუდული პატერნი ჯანმრთელ მოზრდილ ორგანიზმში. მუტაციური დატვირთვის დონის მიხედვით, შბკ ყველა ავთვისებიან ახალწარმონაქმნებს შორის მესამე ადგილზეა, რაც იმუნოთერაპიის გამოყენების გარკვეულ პერსპექტივას ქმნის ამ დავადების დროს. პერსონიფიცირებული უჯრედული სიმსივნისსაწინააღმდეგო ვაქცინების შემუშავება შბკ-ს დროს აქტუალური პრობლემაა, რომელიც მისი სტანდარტიზებისათვის აუცილებელ მრავალ ასპექტს მოიცავს, კერძოდ, სიმსივნური უჯრედები *in vitro* პირობებში კულტივირებისას უფრო მაღალი ტემპით ტრანსფორმირდება, ვიდრე სიმსივნის განვითარების დროს *in vivo*. სტატიაში მოყვანილია შბკ-ს სიმსივნური უჯრედების მოლეკულურ-გენეტიკური თავისებურებების შესწავლის შედეგები ხანგრძლივი კულტივირებისას, აღწერილია უროთელური დაბალდიფერენცირებული, ავთვისებიანობის მაღალი პოტენციალის მქონე კარცინომის უჯრედების კარიოტიპები, გამოვლენილია ციტოგენეტიკური პროფილის კავშირი სიმსივნურ-სპეციფიკური ანტიგენების ექსპრესიასთან. მომზადებულია კუნთოვან-ინვაზიური და კუნთოვან-არაინვაზიური უროთელური კარცინომის უჯრედული ხაზის ორი ვერიფიცირებული კულტურა, რომელიც პოტენციურად გამოყენებულია შბკ-ს საწინააღმდეგო სიმსივნეასოცირებული ვაქცინების შესაქმნელად.

CURATIVE TREATMENT OF COLORECTAL CANCER SOLITARY METASTASIS TO LIVER SUBCAPSULE BY PERCUTANEOUS US GUIDED RADIOFREQUENCY ABLATION USING HYDRODISSECTION (CASE REPORT)

Paksashvili N., Ninikashvili T., Azrumelashvili T., Mizandari M.

Department of Interventional Radiology, Tbilisi State Medical University, “High Technology Medical Center - University Clinic”, Ltd, Georgia

Colorectal Cancer (CRC) is the second leading cause of cancer-related deaths in developed countries [15]. Colorectal liver metastasis (CRLM) develop in half of CRC patients. Surgical resection - a gold standard treatment, is limited by unmet eligibility criteria and high recurrence rate [4]. Percutaneous imaging guided Radiofrequency ablation (RFA) has been introduced as an alternative to surgery, showing the comparable treatment results [16].

RFA is effective and a minimally invasive technique, with low complications. Although RFA has been used with increasing frequency, there are still some technical limita-

tions, depending on ablation size and location. Furthermore, major complications of RFA are closely related to their location in the liver parenchyma [8].

There are a number of strategies helpful for preventing complications during the procedure. They include fluid, gas or balloon interpositions between the adjacent structures and the ablation zone [11].

This case report shows that hydrodissection is technically feasible and effective in improving protection of the adjacent structures by separating them from the liver capsule.

Case report. A 39-year-old male patient with moderately differentiated adenocarcinoma of the colon underwent left hemicolectomy with colostomy formation followed by several courses of chemotherapy. Up to 3 cm metastatic lesion was detected in the liver two years after colectomy – so, patient presents with pT₄N₀M₀ stage of disease. The liver tumor remained stable despite chemotherapy. At this point multidisciplinary discussion decided to perform RFA procedure and patient was referred to our hospital for liver metastasis locoregional ablative therapy.

Contrast enhanced CT revealed 2.5cm diameter subcapsular solitary metastasis in the right liver lobe (segment 5); PET CT showed the radiotracer active uptake in the mass (Fig 1,2).

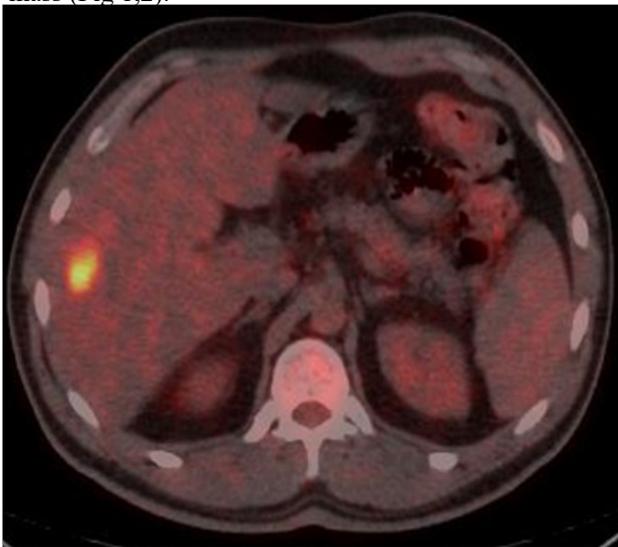


Fig 1. PET-CT reveals radio-tracer active uptake in subcapsular lesion

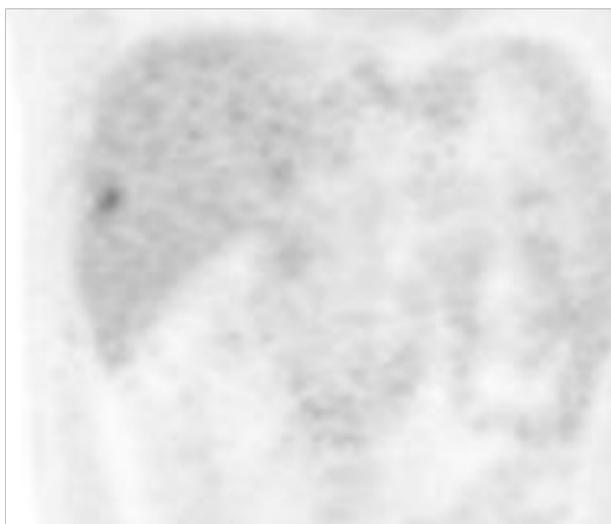


Fig 2. Radio-tracer active uptake in subcapsular lesion (coronal view)

Procedure: Peri-procedural medication included use of intravenous sedation. Because of mass subcapsular location hydrodissection has been performed (Fig. 3); for this peritoneal cavity has been drained under US guidance the day prior to procedure. 1200 ml 5% Glucose solution (as a dielectric) has been injected into the peritoneal cavity before the RF procedure start; fluid injection was stopped after achieving the liver surface 8-10 mm separation from parietal peritoneum as shown by US (Fig. 4). Monopolar RF electrode has been introduced into the liver parenchyma under real-time US guidance (Fig. 5); RF electrode passed through 3-4 cm normal liver parenchyma before reaching the “target” and RF processing has been performed according the routine protocol in order to create 5 cm diameter ablation zone (Fig 6,7,8). RF processing was finished by track ablation for tumor seeding prevention. The process was monitored in real-time by US. The injected fluid was aspirated by the end of the procedure and drainage catheter was withdrawn.

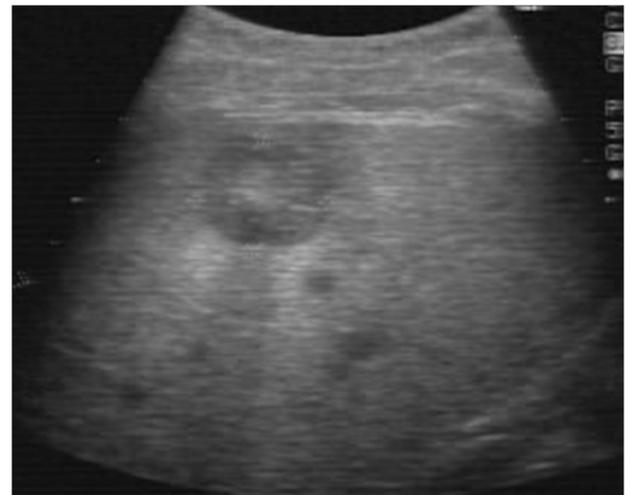


Fig 3. US reveals the “target” - subcapsular mass measuring 25mm



Fig 4. US image - liver capsule has been separated (8-10mm) from parietal peritoneum by hydrodissection



Fig.5. US image - RF electrode moves towards the "target"



Fig. 6. US image - RF electrode with open antennas into the "target"



Fig. 7. US image - RF processing is documented by air bubbles

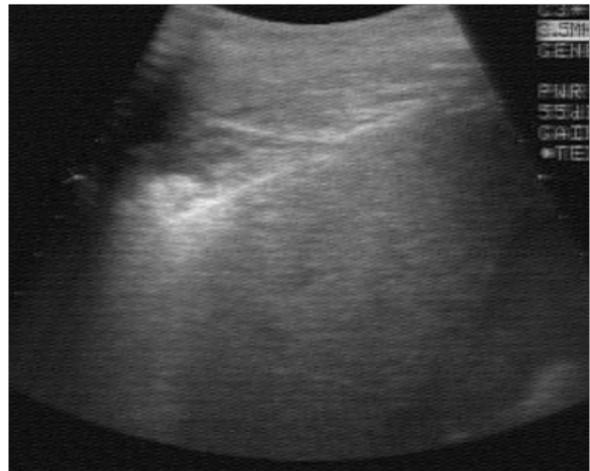


Fig. 8. US image - air bubbles cover the whole mass

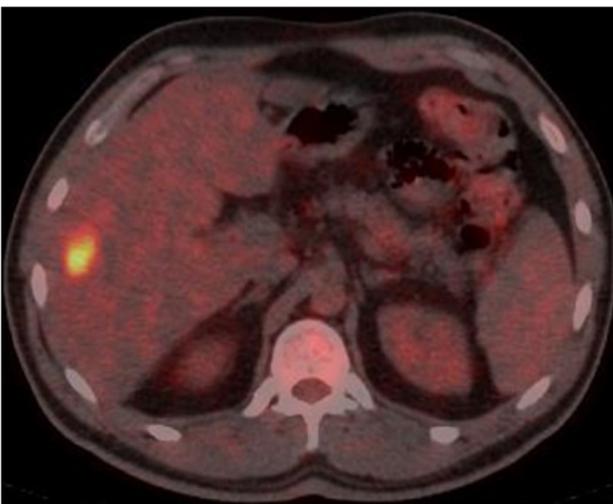


Fig. 9. PET-CT shows the absence of radio-tracer uptake in processed mass

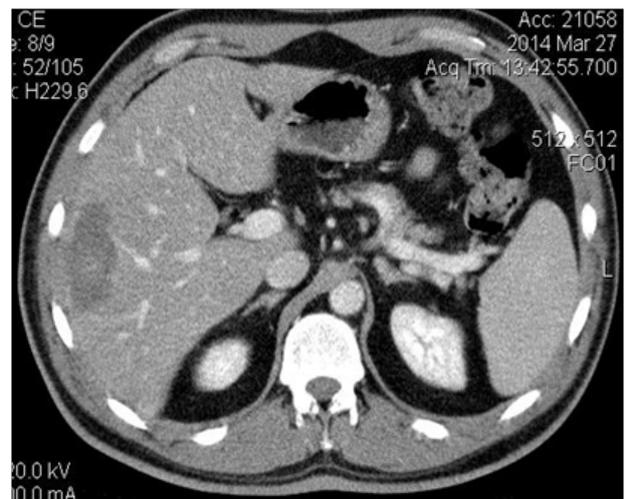


Fig. 10. CT shows mass complete necrosis

Follow-up imaging was performed next day and in 1 month after RF processing. CT scan revealed complete necrosis of tumor, showing no contrast enhancement; follow-up PET-CT scan confirmed the result showing the absence of radio-tracer uptake (Fig 9,10).

No intra-procedural complications were detected and the patient was discharged home the next day.

Although considered to be minimally invasive, percutaneous image-guided thermal ablation is associated with a potential risk of thermal injury to the adjacent vulnerable structures (peritoneum, diaphragm, bowel, gallbladder, bile duct, urinary tract, vessels and nerves) [10].

RFA use near the liver hilum is limited not only by the vascular structures but also by the potential for biliary damage, resulting in stricture or fistula formation, as the large bile ducts do not tolerate heat well [12].

The heat-sink effect is a commonly described limitation of RFA and occurs when flowing blood or air absorbs heat, produced by RF electrode, thereby “cools” the “target” lesion and decreases RFA efficacy; because of this, tumor tissue that is adjacent to vasculature is less susceptible to thermal damage [13].

Caution must also be employed when considering RFA in lesions near the liver capsule or in close proximity to hollow intra-abdominal organs because of perforation risk due to process of the probe insertion or to thermal injury. The colon appears to be more sensitive to this effect than the small bowel or stomach [2].

Lesions located on the surface of the liver is associated with a higher risk of complications [14]. Recent guidelines for RFA of liver lesions have suggested that tumour location at the surface of the liver is a relative contraindication [1]. To overcome these difficulties and to avoid thermal damage to surrounding structures, artificial ascites can be effectively used [9].

Percutaneous RFA with hydrodissection is a feasible, safe and effective technique in the treatment of superficial liver metastasis, enabling to perform the procedure to subcapsular masses safely and improve the visibility of “target” tumor [6].

CT and US are the imaging modalities, widely used for guiding RFA. US technical feasibility is often limited due to poor conspicuity of the tumor; implementation of artificial ascites may enhance the technical feasibility of US-guided RFA [7].

When performing hydrodissection on RFA, saline solution is not suitable because of its high electrical conductivity. In contrast, glucose solution can be used to generate a protective effect during RFA because of its lower conductivity

[5]. Based on existing experience, the tumor should be punctured through normal parenchyma, as RF track subsequent ablation enables to minimize possible seeding [3].

Conclusion. The ablation technique including peritoneal hydrodissection, described in paper avoids capsular breach and appears safe and technically effective in subcapsular lesions treatment.

Acknowledgements. This work was financially supported by the grant from Shota Rustaveli National Science Foundation (Grant# PhD2016-237), Georgia

REFERENCES

1. Crocetti L, de Baere T, Lencioni R. Quality improvement guidelines for radiofrequency ablation of liver tumours // *Cardiovasc Intervent Radiol.* - 2010. – V. 33:11–17.
2. Fonseca AZ, Santin S, Gomes LGL, Waisberg J, Ribeiro Jr. MAF. Complications of radiofrequency ablation of hepatic tumors: Frequency and risk factors // *World Journal of Hepatology.* – 2014. – V. 6(3):107-113.
3. Francica G. Needle track seeding after radiofrequency ablation for hepatocellular carcinoma: prevalence, impact, and management challenge // *J Hepatocell Carcinoma.* – 2017. – V.4:23-27.
4. Giannini EG, Farinati F, Del Poggio P, Di Nolfo MA, Benvegno L, et al. Ten-year outcome of radiofrequency thermal ablation for hepatocellular carcinoma: an Italian experience // *Am J Gastroenterol.* - 2012. – V.107:1588-1589.
5. Gilbert P, Arrington D, Yamada R, Hannegan C, Anderson M et al. Protective Techniques in Image-Guided Percutaneous Hepatic Ablations. *Interventional Oncology* - 2016. – 360.
6. Kim JW, Shin SS, Heo SH, et al. Ultrasound-Guided Percutaneous Radiofrequency Ablation of Liver Tumors: How We Do It Safely and Completely // *Korean Journal of Radiology.* – 2015. – V.16(6):1226-1239.
7. Kim YJ, Lee MW, Park HS. Small hepatocellular carcinomas: ultrasonography guided percutaneous radiofrequency ablation // *Abdom Imaging.* - 2013. – V.38:98-111.
8. Kwon HJ, Kim PN, Byun JH, Kim KW, Won HJ, Shin YM, et al. Various complications of percutaneous radiofrequency ablation for hepatic tumors: radiologic findings and technical tips // *Acta Radiol.* - 2014. – V.55:1082-1092.
9. Liu CH, Yu CY, Chang WC, Dai MS, Chou YC, Huang GS. Computed tomographic-guided percutaneous radiofrequency ablation with hydrodissection of hepatic malignancies in the subcapsular location: Evaluation of safety and technical efficacy // *J Chin Med Assoc.* -2016. – V.79(2): 93-100.
10. Livraghi T, Solbiati L, Meloni MF et al. Treatment of focal liver tumors with percutaneous radio-frequency ablation: complications encountered in a multicenter study // *Radiology.* - 2003. – V. 226:441–451
11. Mendiratta-Lala M, Brook OR, Midkiff BD, Brennan DD, Thornton E, Faintuch S, et al. Quality initiatives: strategies for anticipating and reducing complications and treatment failures in hepatic radiofrequency ablation //

- Radiographics. – V. 2010. – V. 30:1107-1122.
12. Ogawa T, Kawamoto H, Kobayashi Y, Nakamura S, Miyatake H, Harada R, et al. Prevention of biliary complication in radiofrequency ablation for hepatocellular carcinoma-Cooling effect by endoscopic nasobiliary drainage tube // Eur J Radiol. - 2010. – V.73:385-390.
13. Pillai K, Akhter J, Chua TC, Shehata M, Alzahrani N, Al-Alem I, Morris DL Heat Sink Effect on Tumor Ablation Characteristics as Observed in Monopolar Radiofrequency, Bipolar Radiofrequency, and Microwave, Using Ex Vivo Calf Liver Model // Medicine (Baltimore). - 2015. – V. 94(9): e580.
14. Rhim H, Dodd 3rd GD, Chintapalli KN, Wood BT, Dupuy DE, Hvizda JL, et al. Radiofrequency thermal ablation of abdominal tumors: lessons learned from complications. // RadioGraphics. - 2004. - V.24:41-52.
15. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics.CA Cancer // J Clin. - 2016 . - (66):7–30.
16. Van Tilborg AA, Meijerink MR, Sietses C, Van Waesberghe JH, Mackintosh MO, Meijer S, Van Kuijk C, Van Den Tol P. Long-term results of radiofrequency ablation for unresectable colorectal liver metastases: a potentially curative intervention // Br J Radiol. -2011. - V.84 (1002):556-65.

SUMMARY

CURATIVE TREATMENT OF COLORECTAL CANCER SOLITARY METASTASIS TO LIVER SUBCAPSULE BY PERCUTANEOUS US GUIDED RADIOFREQUENCY ABLATION USING HYDRODISSECTION (CASE REPORT)

Paksashvili N., Ninikashvili T., Azrumelashvili T., Mizandari M.

Department of Interventional Radiology, Tbilisi State Medical University, “High Technology Medical Center - University Clinic”, Ltd, Georgia

Case report presents the successful treatment of solitary liver metastasis in a patient with resected colon cancer.

A 39-year-old male underwent left hemicolectomy with colostomy formation followed by chemotherapy for a moderately differentiated adenocarcinoma of the colon. Two years later, a liver metastatic lesion was detected. Patient received chemotherapy; the mass remained stable in size, measuring up to 3 cm in diameter.

Low-invasive percutaneous curative treatment by Radiofrequency ablation was conducted using hydrodissection by dielectric fluid intraperitoneal introduction for hydrodissection. The follow-up imaging showed the complete response to treatment

The ablation technique including peritoneal hydrodissection, described in paper avoids capsular breach and appears safe and technically effective in subcapsular lesions treatment.

Keywords: Liver metastasis, Percutaneous, RFA, hydrodissection.

РЕЗЮМЕ

ЛЕЧЕНИЕ СОЛИТАРНОГО СУБКАПСУЛЯРНОГО МЕТАСТАЗА ПЕЧЕНИ РАДИОЧАСТОТНОЙ АБЛЯЦИЕЙ С ПРИМЕНЕНИЕМ ИНТРАПЕРИТОНЕАЛЬНОЙ ГИДРОДИССЕКЦИИ ПРИ КОЛОРЕКТАЛЬНОМ РАКЕ (СЛУЧАЙ ИЗ ПРАКТИКИ)

**Паксашвили Н.А., Ниникашвили Т.Т.,
Азрумелашвили Т.С., Мизандари М.Г.**

Тбилисский государственный медицинский университет, департамент радиологии; ООО “Центр высоких медицинских технологий, университетская клиника”, Грузия

В статье описан клинический случай лечения солитарного метастаза печени при колоректальном раке. Пациенту мужского пола 39 лет проведена левосторонняя гемиколэктомия с формированием колостомы и последующим проведением нескольких курсов химиотерапии. Спустя два года после операции контрольная КТ выявила субкапсулярный вторичный очаг в печени, размер которого на фоне химиотерапии стабилизировался на уровне до 3 см.

Пациенту проведено малоинвазивное чрезкожное лечение с применением интраперитонеальной гидродиссекции. Контрольное радиологическое исследование документировало полную иррадикацию опухоли.

В представленной статье описан клинический случай, когда при применении радиочастотной абляции субкапсулярных опухолей печени удалось избежать термического повреждения париетального листка перитонеума и диафрагмы с помощью интраперитонеальной гидродиссекции.

რეზიუმე

ღვიძლის კოლორექტული სიმსივნის დროს სუბკაფსულური სოლიტარული მეტასტაზის მკურნალობა რადიოსიხშირული აბლაციით ინტრაპერიტონეული ჰიდროდისექციის გამოყენებით (კლინიკური შემთხვევა)

**ნ. პაკსაშვილი, თ. ნინიკაშვილი,
თ. აზრუმელაშვილი, მ. მიზანდარი**

თბილისის სახელმწიფო სამედიცინო უნივერსიტეტი, რადიოლოგიის დეპარტამენტი; შპს “მაღალი სამედიცინო ტექნოლოგიების ცენტრი, საუნივერსიტეტო კლინიკა”, საქართველო

სტატიაში აღწერილია კოლორექტული სიმსივნის ფონზე განვითარებული ღვიძლის სოლიტარული

რული მეტასტაზის რადიოსისშირული აბლაციით მკურნალობის კლინიკური შემთხვევა.

39 წლის მამაკაცს სწორი ნაწლავის ადენოკარცინომის დიაგნოზით ჩაუტარდა მარცხენამხრივი ჰემიკოლექტომია კოლოსტომის ფორმირებით, შემდგომი ქიმიოთერაპიის რამდენიმე კურსით. ორი წლის შემდეგ საკონტროლო კომპიუტერული ტომოგრაფიული კვლევით გამოვლინდა სუბკაფსულურად ლოკალიზებული მეორადი ხასიათის, 3 სმ ზომის, ქიმიოთერაპიის ფონზე დასტაბილუებული დაზიანება ღვიძლში.

პაციენტს ჩაუტარდა მცირეინვაზიური კანგაუ-ლითი მკურნალობა რადიოსისშირული აბლაციით ინტრაპერიტონეული ჰიდროდისექციის გამოყენებით. საკონტროლო რადიოლოგიური კვლევით დადასტურდა სიმსივნის სრული ირადიკაცია.

აღწერილი კლინიკური შემთხვევა საინტერესოა იმ თვალსაზრისით, რომ ღვიძლის სუბკაფსულური სიმსივნის რადიოსისშირული აბლაციით ინტრაპერიტონეული ჰიდროდისექციის გამოყენებით თავიდან იქნა აცილებული პარაიესული პერიტონეუმისა და ლიაფრაგმის შესაძლო თერმული დაზიანება.

MODULATION OF ANTITUMOR IMMUNE RESPONSE IN MOUSE PROSTATE CANCER MODEL

¹Mitskevich N., ¹Tsertsvadze T., ¹Mchedlishvili K., ²Matchavariani K., ³Guruli G.

¹*Iv. Javakhishvili Tbilisi State University, Division of Immunology and Microbiology;*

²*Tbilisi State Medical University, Department of Allergology and Clinical Immunology, Georgia;*

³*Virginia Commonwealth University, Division of Urology, Richmond VA, USA.*

Prostate cancer is the fifth most common cancer in both sexes combined and the second most common cancer in men. It is also the most common cancer in American men, and second leading cause of cancer death among them., with more than 161 000 new cases expected in the United States in 2017 (American Cancer Society, 2017). In Georgia, 222 men were diagnosed with prostate cancer in 2008 (6th most common cancer in Georgian men), and 143 died with this disease (7th leading cause of cancer death). Obviously, this is a very important health problem worldwide. Though the treatment of the localized prostate cancer is well established and mostly successful, once disease spreads outside of prostate it becomes virtually incurable. The only effective treatment of the prostate cancer is hormonal therapy, which halts the progression of the disease, but does not eliminate it. In addition, basic principles of hormonal therapy (androgen ablation), which was the first successful therapy against advanced cancer, has not been changed much since its introduction more than 50 years ago. Available treatments for the advanced prostate cancer (secondary hormonal manipulations, chemotherapy, etc.) have only limited effectiveness and significant side effects. Therefore, search and development of the effective therapies for the advanced hormone-refractory prostate cancer is one of the critical problems of contemporary cancer treatment.

Immunomodulatory drugs are being used with increasing frequency to treat various cancers. And although some of the greatest advancements have been achieved in the treatment of hematologic malignancies, a growing body of evidence exists to suggest a benefit in the treatment of solid organ tumors, including prostate cancer. Though the

benefits of therapy have been shown in clinical trials, the underlying immune mechanisms responsible for the outcomes have not been completely elucidated. With clinical research confirming the benefits of combination therapy over monotherapy, it has become more important than ever to define the effects each drug has upon the immune system and the target malignancy so that new regimens might be created to maximize efficacy and minimize side effects. As our understanding of tumor immunology has evolved, the role for immunotherapy in the treatment of malignancy has evolved as well. The discovery of cancer testis antigens (CTA) has fueled further research into both adaptive and adoptive immunotherapy techniques. Cancer testis antigens are expressed in the “immunologically privileged” tissues, and therefore autologous T cells do not have inherent tolerance toward them. With limited expression in adult tissue and increased expression in certain malignancies, cancer testis antigens seem ideal targets for immunotherapy. CTA expression is controlled epigenetically by CpG methylation in gene promoters and histone acetylation in neighboring chromatin. Therefore, CTA expression in tumor cells can be augmented by the administration of DNA methylation inhibitors [1-3].

Immunotherapy provides promise for the treatment of prostate cancer and other genitourinary (GU) malignancies. Early studies combining immunomodulatory drugs and chemotherapeutic agents have shown some benefit and prompted further investigation into their use as part of the medical armamentarium against prostate cancer. Current research focuses on two compounds currently being utilized in combination to treat hematologic malignancies,

5-Azacytidine (5-AzaC) and Lenalidomide (Lena). Both, Lena and 5-AzaC have been used in combination with other chemotherapeutic agents with variable results in the treatment of prostate cancer.

Current research focuses on two compounds currently being utilized in combination to treat hematologic malignancies, 5-Azacytidine (5-AzaC) and Lenalidomide. 5-AzaC and its analogues, DNA methylation inhibitors, have been shown to increase tumor exposure to the immune system through various mechanisms including upregulation of gene expression of cancer testis antigens, as well as through direct cytotoxic effects on tumor cells as a result of DNA demethylation [2-4]. It has also shown to have some effect on the immune system, though the exact mechanism of these effects not well known at this time [5-8]. Lenalidomide and its analogues, synthetic compounds created from thalidomide to be more potent with less neurologic side effects, have been shown to augment both innate and adaptive immune responses resulting in improved response to malignancies when combined with chemotherapeutic drugs [9]. It has also been confirmed that the drugs exhibit direct inhibitory effects on angiogenesis and tumor cell proliferation [9-12]. Though a lot of research has been done on the effects these drugs have upon NK cells and T lymphocytes [13-16]. Not much is known about their effect on dendritic cells, and no studies to date have looked at their combination in the treatment of prostate cancer.

Material and methods. *Mice:* C57BL/6 and balb/c mice have been obtained. Animals were maintained at the

vivarium at Iv. Javakhishvili Tbilisi State University according to standard guidelines. *Prostate Cancer Cell Line:* RM-1 - a murine prostate cancer cell line and *Study Drugs:* Lenalidomide and 5-AzaC were gifted by Virginia Commonwealth University. Dendritic cells: briefly, bone marrow has been collected from tibias and femurs of Male C57BL/6 animals.

At first, we evaluated the compounds (Lenalidomide, 5-Azacytidine) separately in vitro and studied their effects on prostate cancer RM-1 cells and dendritic cells (DC).

We studied a proliferation of the cells using the *Cell Proliferation Assay*: Dendritic cells and RM-1 cells in suspension were exposed to different concentrations of lenalidomide. A DMSO control and one group with no treatment were also included.

Flow cytometry was performed on dendritic cells after their stimulation with different concentrations of lenalidomide DC were stained with following antibodies: MHC class I, MHC class II, CD40, CD80, CD86, CD205.

RT-PCR was performed on all groups looking at P1A, ET_A and ET_B gene expression. Expression of both endothelin genes was identified in all groups prompting performance of real time PCR

The production of IL-12 and IL-15 was identified in all groups using ELISA and their levels in the supernatants were determined.

RM-1 Cells Proliferation Assay Using Lenalidomide

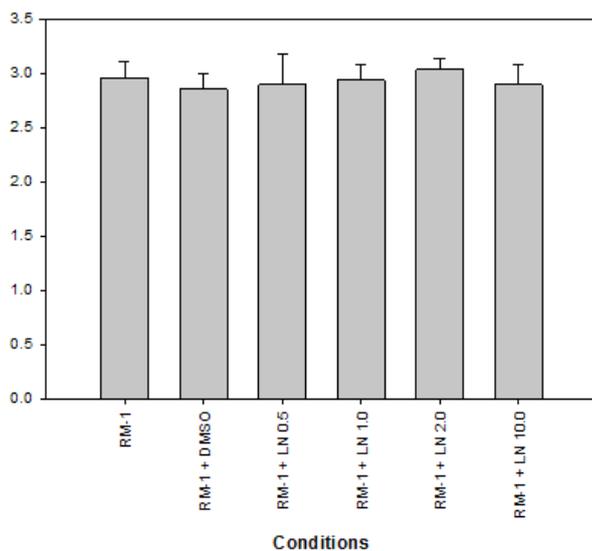


Fig. 1. Dendritic cells proliferation assay. DC without stimulation and DC treated with DMSO (solvent for lenalidomide) provided controls. Lenalidomide was used at the concentration of 0.5µM, 1.0µM, 2.0µM and 10µM. No statistical difference was seen when comparing different conditions.

DC – dendritic cells, LN - lenalidomide

Dendritic Cells Proliferation Assay Using Lenalidomide

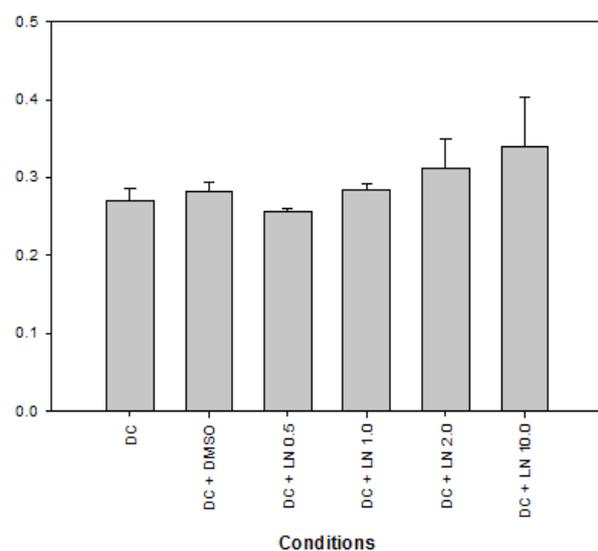


Fig. 2. RM-1 prostate cancer cells proliferation assay. Untreated RM-1 cells and RM-1 cells treated with DMSO (solvent for lenalidomide) provided controls. Lenalidomide was used at the concentration of 0.5µM, 1.0µM, 2.0µM and 10µM. No statistical difference was seen in cell proliferation when comparing different conditions.

LN - lenalidomide

Results and their discussion. *Cell proliferation Assay (Lenalidomide):* Dendritic cells and RM-1 cells in suspension were exposed to 4 different concentrations of lenalidomide from 0.5- 10 μ M. A DMSO control and one group with no treatment were also included. The cell proliferation assay was then performed, as described above, on each group. Dendritic cell proliferation increased slightly with increasing concentrations of lenalidomide. RM-1 cell proliferation increased up to concentrations of 2 μ M after which it decreased in a dose dependent fashion. The differences in cell proliferation between groups did not reach statistical significance with either dendritic cells or RM-1 cells (Figs. 1 and 2).

Cell proliferation Assay (5-Azacididine): Dendritic cells and RM-1 cells in suspension were exposed to two different concentrations of 5-AzaC, 0.5 μ M and 1.0 μ M. One group with no treatment was also included as a control. The cell proliferation assay was then performed, as described above, on each group. Cell proliferation in both DC and RM-1 cells decreased in a dose dependent fashion with increasing concentrations of 5-AzaC. For the DC statistically significant difference from control was seen only at the concentration of 1.0 μ M (P=0.029). Results are shown in Fig. 3.

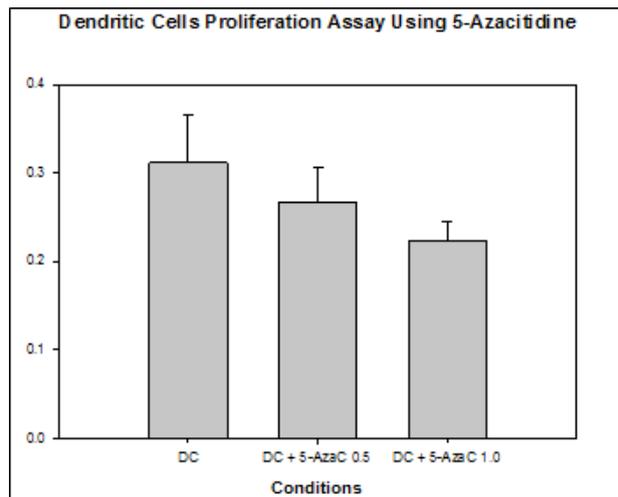


Fig. 3. Dendritic cells proliferation assay. DC without stimulation provided control. 5-Azacididine (5-AzaC) was used at the concentrations of 0.5 μ M and 1.0 μ M. Statistically significant difference in cell proliferation from the control (decrease) was seen at the 5-AzaC concentration of 1.0 μ M.

5-AzaC – 5-Azacididine, DC – dendritic cells

* Depicts statistically significant difference in comparison to untreated DC

For the RM-1 cells (Fig. 4) the difference between the control and both 5-AzaC treated cells were statistically significant (P=0.016 for the group treated with the concentration of 0.5 μ M and P=0.004 for the group treated with the concentration of 1.0 μ M of 5-AzaC). There was no statistically significant difference between the 5-AzaC treated groups.

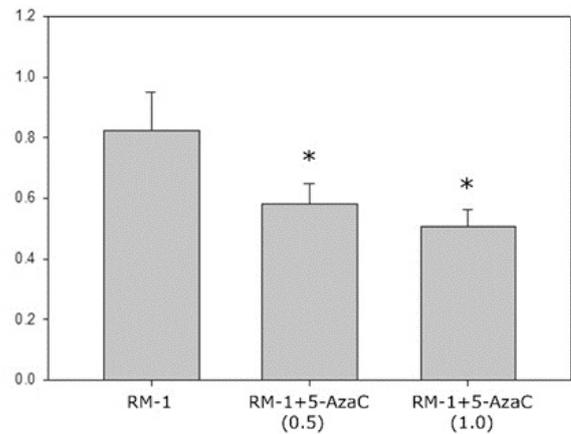


Fig. 4. RM-1 cells proliferation assay. RM-1 cells without treatment provided control. 5-Azacididine (5-AzaC) was used at the concentrations of 0.5 μ M and 1.0 μ M. Statistically significant difference in cell proliferation from the control (decrease) was seen at both 5-AzaC concentrations.

5-AzaC – 5-Azacididine, RM-1 – murine prostate cancer cells
* Depicts statistically significant difference in comparison to RM-1 cells

Flow Cytometry (Dendritic Cells and Lenalidomide): Flow cytometry was performed on dendritic cells after their stimulation with different concentrations of lenalidomide. Dendritic cells exposed to DMSO (solvent for lenalidomide) acted as control. Lenalidomide was added during the last 48 hours of culture, after which DC were harvested, stained with different antibodies (MHC class I, MHC class II, CD40, CD80, CD86 and CD205) and flow cytometry was performed. Results are presented in Fig. 5.

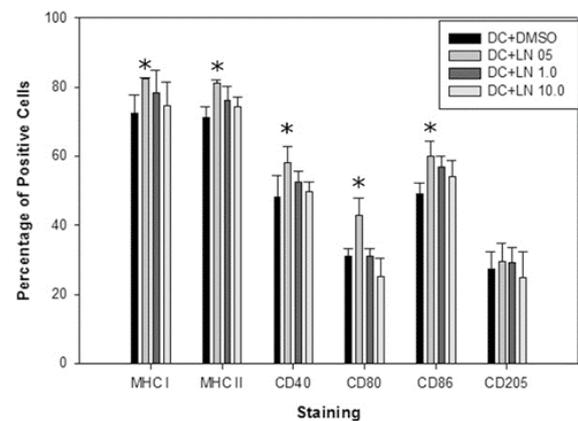


Fig. 5. Flow cytometry results for DC treated with lenalidomide. DC treated with DMSO (0.1%, solvent for lenalidomide) provided control. Lenalidomide was used at the concentration of 0.5 μ M, 1.0 μ M, and 10 μ M. DMSO and lenalidomide were applied for the last 48 hours of culture. DC were stained with following antibodies: MHC class I, MHC class II, CD40, CD80, CD86, CD205.

LN – lenalidomide, DC – dendritic cells

* Depicts statistically significant difference in comparison to DMSO-treated DC

As it can be seen, there was approximately 10% rise in the expression of most DC markers at the lenalidomide concentration of 0.5 μ M, and these differences were statistically significant ($P < 0.001$). Comparison dot-plots are presented in Fig. 6. We could not see any significant differences at other concentrations of lenalidomide.

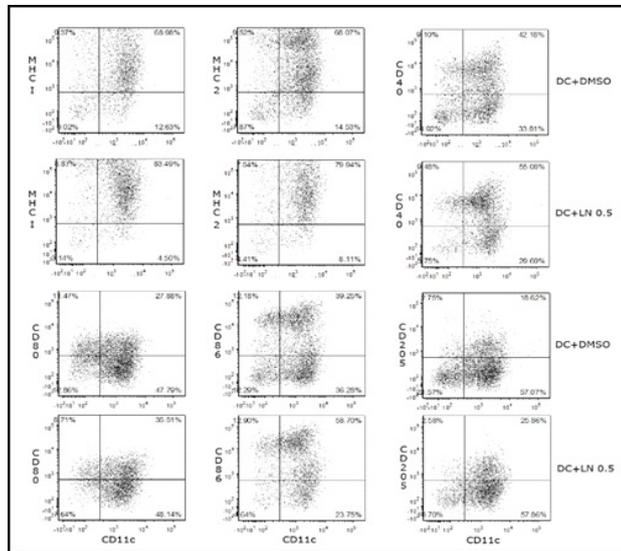


Fig. 6. Comparison dot-plots between DC treated with DMSO (0.1%) and lenalidomide (0.5 μ M) for the last 48 hours of culture. There was approximately 10% rise in the expression of DC markers after the exposure to lenalidomide at the 0.5 μ M concentration.
LN – lenalidomide, DC – dendritic cells

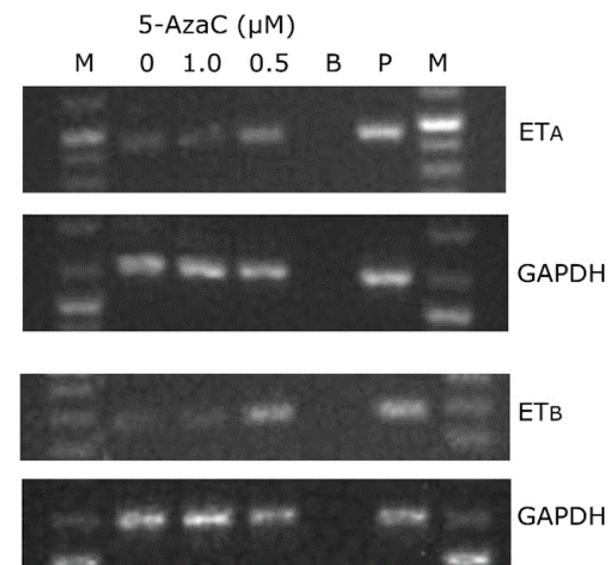


Fig. 7. Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction performed on dendritic cells after their stimulation with 5-AzaC for the last 48 hours of culture to determine the dose-dependent induction of the endothelin receptors A and B. Untreated DC provided the control. 5-AzaC was used at the concentrations of 0.5 μ M and 1.0 μ M. Treated and control cells were harvested, total RNA was extracted and used as a template to determine the expression of endothelin

receptors (ET_A and ET_B) and control gene GAPDH. B – blank, P – positive control, M – DNA molecular weight markers.

5-AzaC – 5-azacitidine, ET_A – endothelin receptor A, ET_B – endothelin receptor B

Polymerase Chain Reaction (Endothelins): Dendritic cells in suspension were exposed to two different concentrations of 5-AzaC, 0.5 μ M and 1.0 μ M. One group with no treatment was also included. RT-PCR was performed on all groups looking at ET_A and ET_B gene expression. Expression of both endothelin genes was identified in all groups (Fig. 7) prompting performance of real time PCR (Fig. 8). At a concentration of 0.5 μ M, this revealed an increase of ET_A expression on DC by 1.62 ± 0.02 , and ET_B receptor expression increased by 2.39 ± 0.09 (Both were statistically significant, $P < 0.001$). When we used a concentration of 1.0 μ M a somewhat smaller increase was noted (1.47 ± 0.03 for ET_A , $P = 0.001$, in comparison to control, and 1.82 ± 0.09 for ET_B , $P < 0.001$). Interestingly, stimulation of endothelin receptor expression on DC by 5-AzaC was statistically higher at a lower dose ($P = 0.012$ for ET_A receptors expression and $P = 0.011$ for ET_B receptors).

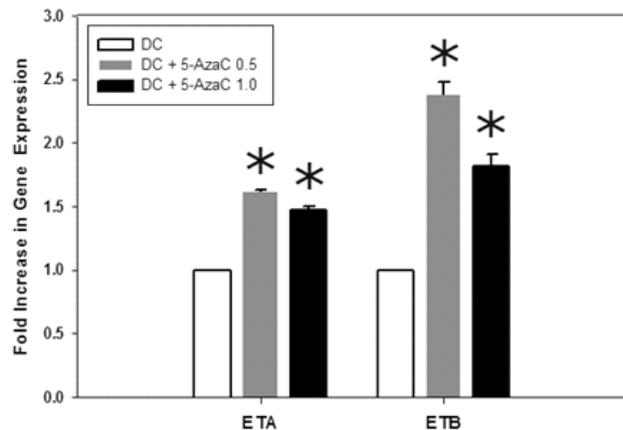


Fig. 8. Quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR) for the expression of endothelin receptors A and B (ET_A and ET_B) in DC after their treatment with different concentrations of 5-AzaC (0.5 μ M and 1.0 μ M).

5-AzaC – 5-azacitidine, DC – dendritic cells, ET_A – endothelin receptor A, ET_B – endothelin receptor B.

* Depicts statistically significant difference in comparison to untreated DC

Polymerase Chain Reaction (PIA): To determine the presence of P1A (cancer testis antigen) antigen in RM-1 cells and the possibility to change its expression, RM-1 cells were exposed to 5-AzaC and lenalidomide. These substrates were added to the RM-1 cultures and the expression of P1A was assessed. RM-1 cells were exposed to 9 different concentrations of lenalidomide from 0.5 μ M to 40 μ M. A DMSO control and one group with no treatment were also included. RT-PCR was performed on all groups looking at P1A gene expression. No expression of P1A was identified

in any group exposed to lenalidomide thus precluding the need to perform quantitative PCR on the groups.

RM-1 cells in suspension were exposed to two different concentrations of 5-AzaC, 0.5 μM and 1.0 μM . One group with no treatment was also included. RT-PCR was then performed on all groups looking at P1A gene expression. Expression of P1A was identified in the groups exposed to 5-AzaC prompting the performance of real time PCR which showed a dose dependent increase in P1A expression in RM-1 cell exposed to 5-AzaC. Experiments were repeated three times with similar results, and combined data are presented (mean \pm SEM). There was a 3.23 ± 0.26 fold increase in P1A expression for 5-AzaC at 0.5 μM concentration and 6.21 ± 0.36 fold increase for 5-AzaC at 1.0 μM concentration (Fig. 9). The difference among all three groups is statistically significant.

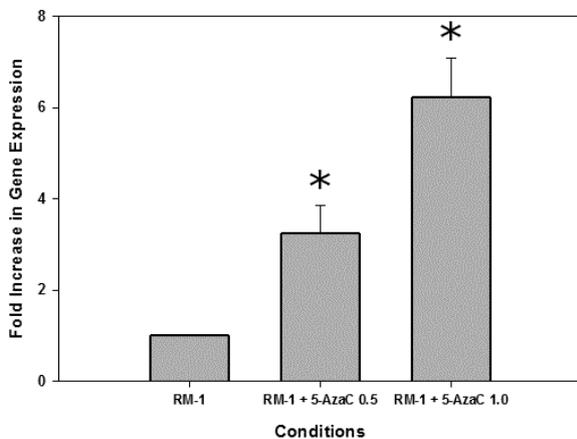


Fig. 9. Quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR) for the expression of P1A (cancer testis antigen) gene in DC after their treatment with different concentrations of 5-AzaC (0.5 μM and 1.0 μM). There was a statistically significant dose-dependent increase of the P1A gene expression.

5-AzaC – 5-Azacytidine, RM-1 – murine prostate cancer cells

* Depicts statistically significant difference in comparison to untreated RM-1 cells

ELISA (IL 12 and IL 15): Dendritic cells were grown in culture and matured with TNF α for the last 48 hours. Mature DC were treated for the last 48 hours with 5-AzaC at concentrations of 0.5 μM and 1.0 μM . Untreated mature DC (no 5-AzaC) provided the control (Fig. 10). The production of IL-12 and IL-15 was identified in all groups using ELISA and their levels in the supernatants were determined. IL-12 production increased in a dose dependent fashion with increasing concentrations of 5-AzaC with the highest level was noted in the group exposed to 1.0 μM of 5-AzaC, though both concentrations (0.5 μM and 1.0 μM) resulted in the statistically significant increase in IL-12 production ($P=0.002$ and $P<0.001$, respectively). IL-15 production on the other hand increased only in the group exposed to 1.0 μM 5-AzaC ($P=0.018$). These data suggest that 5-AzaC

affects IL-12 production in DC in dose-dependent manner, while only its high concentration resulted in the increased production of IL-15 by DC.

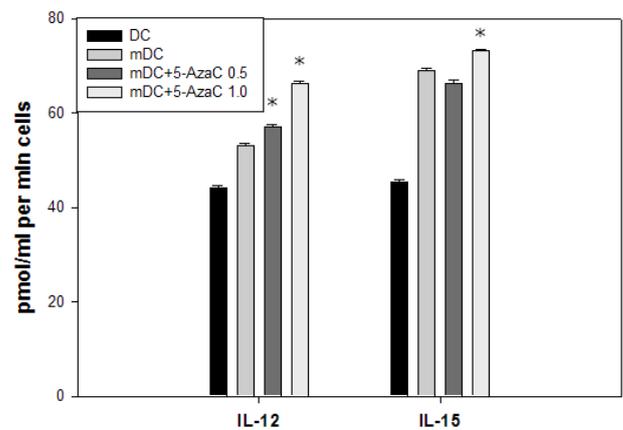


Fig. 10. The production of IL-12 and IL-15 by DC after exposure to 5-AzaC at different concentrations (0.5 μM and 1.0 μM) for 48 hours.

5-AzaC – 5-azacytidine, DC – dendritic cells, mDC – mature dendritic cells

* Depicts statistically significant difference in comparison to mDC

Early studies combining immunomodulatory drugs and chemotherapeutic agents have shown some benefit and prompted further investigation into their use as part of the medical armamentarium against prostate cancer. Both lenalidomide and 5-AzaC have been used in combination with other chemotherapeutic agents with variable results in the treatment of prostate cancer [17-23]. The addition of lenalidomide to 5-AzaC has been shown to be of therapeutic benefit in the treatment of certain hematologic malignancies [24-27]. The underlying mechanisms identified, theoretically responsible for the benefit obtained from combination therapy, are not confined to hematologic malignancies and should apply to a wide variety of solid organ tumors. Our findings suggest that there may be a potential benefit in combining lenalidomide and 5-AzaC in the treatment of prostate cancer and help to further define the underlying impact these medications have upon the host immune system and tumor cells through the use of a murine model.

Although our results suggested, consistent with current theory proposed by other studies, that lenalidomide enhances dendritic cell proliferation in vitro and in higher doses is cytotoxic to murine prostate cancer cells, these results did not reach statistical significance. This indicates that with further testing, it might be possible to reach statistical significance, but that the differences would be small. This finding would seem to indicate that lenalidomide may increase dendritic cell proliferation slightly, but that it primarily alters immune function through other mechanisms. Flow cytometry experiments for the expression of DC markers demonstrated approximately 10% increase in the expression of most DC markers after the exposure to the 0.5 μM

concentration of the lenalidomide. Higher concentrations did not affect DC markers expression (is it possible that higher concentrations of the lenalidomide became suppressive?). Anyway, this seems to be an area in great need of future studies. In Contrast, 5-AzaC caused a dose dependent decrease in both the proliferation of dendritic cells and RM-1 cells. 5-AzaC is a DNA methylation inhibitor and, as expected, is cytotoxic to proliferating cells. Despite this fact, 5-AzaC appears to activate dendritic cells with the increased expression of endothelin receptors and with rise in the production of IL-12 and IL-15. A dose dependent increase in the production of IL-12 and IL-15 by dendritic cells in response to increasing concentrations of 5-AzaC when given with TNF α , would in turn activate both the innate immune system through its action on natural killer cells and the adaptive immune system through its action on t helper cells. Though our findings are preliminary and need to be repeated, this is in conflict with previous studies which have suggested that 5-AzaC decreases NK cell cytotoxicity and dendritic cell function. It is possible either that previous studies mischaracterized the impact 5-AzaC has on dendritic cell function by focusing on alternative measures of their activity, or it may be that the upregulation of dendritic cell function is counteracted by the direct cytotoxic effect on dendritic cell proliferation identified in our cell proliferation studies.

Regardless of its direct impact on immune effector cells, it is clear that 5-AzaC increases tumor exposure to the immune system through its upregulation of Cancer Testis Antigens [2,3, 28-33]. This was confirmed in our study in a murine model of prostate cancer. Though, one other group has shown its upregulation in response to exposure to 5-AzaC in a murine lung cancer cell line, no group has specifically looked at the upregulation of P1A expression in a murine prostate cancer cell line. With lenalidomide's ability to increase immune responses and 5-AzaC's ability to increase tumor exposure to the immune system, it may be possible to treat prostate cancer with this combination for patient benefit.

Conclusion: 5-AzaC appears to activate DC with the increased expression of endothelin receptors and with rise in the production of IL-12 and IL-15. 5-AzaC affects IL-12 production in both immature and mature DC, while it has significant impact on IL-15 production only in immature DC. 5-AzaC caused a dose dependent decrease in both the proliferation of dendritic cells and RM-1 cells. Cell proliferation in both DC and RM-1 cells decreased in a dose dependent fashion with increasing concentrations of 5-AzaC. Increasing concentrations of lenalidomide slightly increased proliferation of DC. The differences in cell proliferation between groups did not reach statistical significance with either DC or RM-1 cells.

Therefore, this combination of epigenetic modifications and immunomodulation by 5-AzaC and Lenalidomide should

increase tumor immunogenicity and it enhanced DC function; These compounds might have a role in the treatment of advanced prostate cancer.

REFERENCES

1. Guo, Z. S., Hong, J. A., Irvine, K. R. et al. De novo induction of a cancer/testis antigen by 5-aza-2'-deoxycytidine augments adoptive immunotherapy in a murine tumor model // *Cancer Res*, 2006; 66: 1105.
2. Dubovsky, J. A., McNeel, D. G. Inducible expression of a prostate cancer-testis antigen, SSX-2, following treatment with a DNA methylation inhibitor // *Prostate* 2007; 67: 1781.
3. Dubovsky, J. A., McNeel, D. G., Powers, J. J. et al. Treatment of chronic lymphocytic leukemia with a hypomethylating agent induces expression of NXF2, an immunogenic cancer testis antigen // *Clin Cancer Res*. 2009; 15: 3406.
4. Patra, A., Deb, M., Dahiya, R. et al. 5-Aza-2'-deoxycytidine stress response and apoptosis in prostate cancer // *Clin Epigenetics* 2011; 2: 339.
5. Triozzi, P. L., Aldrich, W., Achberger, S. et al. Differential effects of low-dose decitabine on immune effector and suppressor responses in melanoma-bearing mice // *Cancer Immunol Immunother* 2012; 61: 1441.
6. Stepanek, I., Indrova, M., Bieblova, J. et al. Effects of 5-azacytidine and trichostatin A on dendritic cell maturation // *J Biol Regul Homeost Agents* 2011; 25: 517.
7. Frikeche, J., Clavert, A., Delaunay, J. et al. Impact of the hypomethylating agent 5-azacytidine on dendritic cells function // *Exp Hematol*. 2011; 39: 1056.
8. Bao, L., Dunham, K., Lucas, K. MAGE-A1, MAGE-A3, and NY-ESO-1 can be upregulated on neuroblastoma cells to facilitate cytotoxic T lymphocyte-mediated tumor cell killing // *Cancer Immunol Immunother* 2011; 60: 1299.
9. Kotla, V., Goel, S., Nischal, S. et al. Mechanism of action of lenalidomide in hematological malignancies // *J Hematol Oncol*. 2009; 2: 36.
10. Dredge, K., Marriott, J. B., Macdonald, C.D. et al. Novel thalidomide analogues display anti-angiogenic activity independently of immunomodulatory effects // *Br J Cancer* 2001; 87: 1166.
11. Bartlett, J.B., Dredge, K., Dalglish, A.G. The evolution of thalidomide and its IMiD derivatives as anticancer agents // *Nat Rev Cancer* 2004; 4: 314.
12. Wu, L., Adams, M., Carter, T. et al. lenalidomide enhances natural killer cell and monocyte-mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity of rituximab-treated CD20+ tumor cells // *Clin Cancer Res*. 2008; 14: 4650.
13. Henry, J.Y., Labarthe, M.C., Meyer, B. et al. Enhanced cross-priming of naive CD8+ T cells by DCs treated by the IMiDs((R)) immunomodulatory compounds Lenalidomide and Pomalidomide // *Immunology* 2013.
14. Richter, J., Neparidze, N., Zhang, L. et al. Clinical regressions and broad immune activation following combination therapy targeting human NKT cells in myeloma // *Blood* 2013; 121: 423.

15. Luptakova, K., Rosenblatt, J., Glotzbecker, B. et al. Lenalidomide enhances anti-myeloma cellular immunity // *Cancer Immunol Immunother.* 2013; 62: 39.
16. Neuber, B., Herth, I., Tolliver, C. et al. Lenalidomide enhances antigen-specific activity and decreases CD45RA expression of T cells from patients with multiple myeloma // *J Immunol.* 2011; 187: 1047.
17. Thibault, A., Figg, W. D., Bergan, R. C. et al. A phase II study of 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine) in hormone independent metastatic (D2) prostate cancer // *Tumori* 1998; 84: 87.
18. Yi, X. M., Gong, J., Dong, J. et al. Inhibitory effect of 5-aza-2'-deoxycytidine combined with docetaxel on prostate cancer PC3 cells in vitro // *Zhonghua Nan Ke Xue* 2011; 17: 247.
19. Shang, D., Liu, Y., Liu, Q. et al. Synergy of 5-aza-2'-deoxycytidine (DAC) and paclitaxel in both androgen-dependent and -independent prostate cancer cell lines // *Cancer Lett* 2009; 278: 82.
20. Nabhan, C., Petrylak, D.P. The role of IMiDs alone or in combination in prostate cancer // *Clin Genitourin Cancer* 2012; 10: 141.
21. Henry, J. Y., Lu, L., Adams, M. et al. Lenalidomide enhances the anti-prostate cancer activity of docetaxel in vitro and in vivo // *Prostate* 2011; 72: 856.
22. Galsky, M. D., Vogelzang, N. J.: Docetaxel-based combination therapy for castration-resistant prostate cancer. *Ann Oncol.* 2010; 21: 2135.
23. Mathew, P., Tannir, N., Tu, S. M. et al. A modular Phase I study of lenalidomide and paclitaxel in metastatic castration-resistant prostate cancer following prior taxane therapy // *Cancer Chemother Pharmacol.* 2010; 65: 811.
24. Pollyea, D. A., Kohrt, H. E., Gallegos, L. et al. Safety, efficacy and biological predictors of response to sequential azacitidine and lenalidomide for elderly patients with acute myeloid leukemia // *Leukemia* 2011.
25. Ramsingh, G., Westervelt, P., Cashen, A. F. et al. A phase 1 study of concomitant high-dose lenalidomide and 5-azacitidine induction in the treatment of AML // *Leukemia* 2013; 27: 725.
26. Sekeres, M. A., List, A. F., Cuthbertson, D. et al. Phase I combination trial of lenalidomide and azacitidine in patients with higher-risk myelodysplastic syndromes // *J Clin Oncol.* 2010; 28: 2253.
27. Sekeres, M. A., O'Keefe, C., List, A. F. et al. Demonstration of additional benefit in adding lenalidomide to azacitidine in patients with higher-risk myelodysplastic syndromes // *Am J Hematol.* 2011; 86: 102.
28. Coral, S., Sigalotti, L., Altomonte, M. et al. 5-aza-2'-deoxycytidine-induced expression of functional cancer testis antigens in human renal cell carcinoma: immunotherapeutic implications // *Clin Cancer Res.* 2002; 8: 2690.
29. Dasari, V. K., Deng, D., Perinchery, G. et al. DNA methylation regulates the expression of Y chromosome specific genes in prostate cancer // *J Urol.* 2002; 167: 335.
30. Wischnewski, F., Pantel, K., Schwarzenbach, H. Promoter demethylation and histone acetylation mediate gene expression of MAGE-A1, -A2, -A3, and -A12 in human cancer cells // *Mol Cancer Res.* 2006; 4: 339.
31. Chung, W., Kwabi-Addo, B., Ittmann, M. et al. Identification of novel tumor markers in prostate, colon and breast cancer by unbiased methylation profiling // *PLoS One* 2008; 3: e2079.
32. Park, J.H., Song, M.H., Lee, C.H. et al. Expression of the human cancer/testis antigen NY-SAR-35 is activated by CpG island hypomethylation // *Biotechnol Lett* 2011; 33: 1085.
33. Smith, H.A., Cronk, R.J., Lang, J.M. et al. Expression and immunotherapeutic targeting of the SSX family of cancer-testis antigens in prostate cancer // *Cancer Res.* 2011; 71: 6785.

SUMMARY

MODULATION OF ANTITUMOR IMMUNE RESPONSE IN MOUSE PROSTATE CANCER MODEL

¹Mitskevich N., ¹Tsertsvadze T., ¹Mchedlishvili K., ²Matchavariani K., ³Guruli G.

¹*Iv. Javakhishvili Tbilisi State University, Division of Immunology and Microbiology;*

²*Tbilisi State Medical University, Department of Allergology and Clinical Immunology, Georgia;*

³*Virginia Commonwealth University, Division of Urology, Richmond VA, USA*

Aim of study - prostate cancer is second most common cancer in men worldwide, and fifth leading cause of death from cancer in men (6.6% of the total men deaths). Unfortunately, once cancer spreads outside of prostate, it becomes incurable. Androgen deprivation can provide some relief, but resistance will develop eventually, and at that time no effective treatment options are left to the patient. Therefore, the search of alternative treatment modalities is paramount. In this article we evaluated the role of epigenetic modifier 5-azacitidine (5-AzaC) and immunomodulator - Lenalidomide and their possible impact on the immune response in the murine prostate cancer model.

We studied their impact on murine prostate cancer cells and on dendritic cells (DC), the most potent antigen-presenting cells known.

RM-1 is a murine prostate cancer cell line, resembling hormone-independent model, which is a lethal variant of this disease in humans. Dendritic cells were obtained from murine bone marrow. Cell proliferation assays were performed to evaluate the effect of 5-AzaC and lenalidomide on prostate cancer and DC. Flow cytometry, ELISA and real-time PCR was performed to evaluate the effect of these compounds on DC and prostate cancer cells.

5-AzaC treatment of RM-1 prostate cancer cells and DC resulted in the decreased proliferation for both, while lenalidomide had no effect. DC were treated with lenalidomide and the expression of surface markers MHC Class I, MHC Class II, CD80, CD86, CD 205, and CD40 was increased. Secretion of IL-12 and IL-15 by DC increased significantly with addition of 5-AzaC. There was also the change in the expression of endothelin receptors on DC, which can affect their function. 5-AzaC also resulted in the increased expres-

sion of cancer-testis antigen, P1A, by prostate cancer cells. Combination of epigenetic modifications and immunomodulation by 5-AzaC and lenalidomide should increase tumor immunogenicity and it enhanced DC function. Therefore, these compounds might have a role in the treatment of advanced prostate cancer.

Keywords: prostate cancer, antitumor immunity, immunomodulatory drugs, lenalidomide, 5-azacitidine, dendritic cells.

РЕЗЮМЕ

МОДУЛЯЦИЯ АНТИОПУХОЛЕВОГО ИММУННОГО ОТВЕТА В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ РАКА ПРОСТАТЫ У МЫШЕЙ

¹Мицкевич Н.Г., ¹Церцвадзе Т.Ш., ¹Мchedlishvili К.Н., ²Мачавариани К.Дж., ³Гурули Г.Г.

¹Тбилисский государственный университет им. И. Джавахишвили, кафедра иммунологии и микробиологии;
²Тбилисский государственный медицинский университет, департамент аллергологии и клинической иммунологии, Грузия; ³Университет Содружества Вирджинии, департамент урологии, Ричмонд, США

В статье оценена роль эпигенетического модификатора 5-азациитидина (5-AzaC) и иммуномодулятора леналидомида и их возможное влияние на иммунный ответ в модели рака предстательной железы мыши. Изучено их влияние на мышинные клетки рака предстательной железы и дендритные клетки (ДК), которые известны как наиболее эффективные и антиген-презентирующие клетки.

RM-1 представляет собой линию клеток рака предстательной железы у мышей, сходную с не зависящей от гормонов моделью, которая является смертельной для людей. Дендритные клетки были получены из мышинного костного мозга. Проанализировали пролиферацию клеток для оценки влияния 5-AzaC и леналидомида на рак предстательной железы и ДК. Проведена проточная цитометрия, ELISA и PCR в реальном времени для оценки влияния этих соединений на ДК и клетки рака предстательной железы.

Обработка 5-AzaC-ом RM-1 клеток предстательной железы и ДК приводила к уменьшению их пролиферации, тогда как леналидомид не оказывал никакого эффекта. ДК обрабатывали леналидомидом и изучали экспрессию поверхностных маркеров МНС класса I, МНС класса II, CD80, CD86, CD 205 и CD40, которая оказалась увеличенной. Секреция IL-12 и IL-15 с помощью ДК значительно увеличилась с добавлением 5-AzaC. Наблюдалось также изменение экспрессии рецепторов эндотелина на ДК, что может повлиять на их функцию. 5-AzaC также привел к увеличению экспрессии антигена рака яичка, P1A, клетками рака предстательной железы. Сочетание эпигенетических модификаций и иммуномодуляции с помощью 5-AzaC и Леналидомида должно увеличить иммуногенность опухоли и улучшить функцию ДК. Следовательно, эти соединения могут играть определенную роль в лечении рака предстательной железы.

რეზიუმე

ანტისიმსივნური იმუნური პასუხის მოდულაცია
პროსტატის კიბოს თავის ექსპერიმენტულ მოდელში

¹ნ. მიცკევიჩი, ¹თ. ცერცვაძე, ¹კ. მჭედლიშვილი, ²კ. მაჭავარიანი, ³გ. გურული

¹ივ. ჯავახიშვილის სახ. თბილისის სახელმწიფო უნივერსიტეტი, იმუნოლოგიისა და მიკრობიოლოგიის კათედრა; ²თბილისის სახელმწიფო სამედიცინო უნივერსიტეტი, ალერგოლოგიისა და კლინიკური იმუნოლოგიის დეპარტამენტი, საქართველო; ³ვირჯინიის თანამეგობრობის უნივერსიტეტი, უროლოგიის დეპარტამენტი, რიჩმონდი, აშშ

კვლევაში შეფასებულია ეპიგენეტიკური მოდიფიკატორის - 5-აზაციტიდინის (5-AzaC) და იმუნო-მოდულატორის - ლენალიდომიდის შესაძლო გავ-

ლენა იმუნურ პასუხზე პროსტატის კიბოს თავის ექსპერიმენტულ მოდელში. შესწავლილია მათი ზემოქმედება თავის პროსტატის სიმსივნურ და

დენდრიტულ უჯრედებზე (DC). გამოყენებულია თაგვის პროსტატის კიბოს ჰორმონდამოუკიდებელი მოდელის მსგავსი უჯრედული ხაზი (RM-1), რომელიც ადამიანისთვის ამ დაავადების ლეტალურ ვარიანტს წარმოადგენს.

დენდრიტული უჯრედები მიღებული იქნა თაგვის ძვლის ტვინიდან. 5-აზაციტიდინისა და ლენალიდომიდის ეფექტის შესაფასებლად პროსტატის კიბოს და დენდრიტულ უჯრედებზე ჩატარდა უჯრედების პროლიფერაციული კვლევა, გამდინარე ციტომეტრია, იმუნოფერმეტული ანალიზი (ELISA) და პოლიმერაზის ჯაჭვური რეაქცია რეალურ დროში.

5-აზაციტიდინის დამატების შედეგად RM-1 პროსტატის კიბოსა და დენდრიტულ უჯრედებზე დაფიქსირდა პროლიფერაციის დაქვეით-

ება; ლენალიდომიდის ეფექტი არ გამოვლინდა. დენდრიტული უჯრედების ლენალიდომიდით დამუშავების შემდეგ დაფიქსირდა ზედაპირული მარკერების - MHC I, MHC II, CD80, CD86, CD 205 და CD40 - ექსპრესიის მომატება. დენდრიტულ უჯრედებზე 5-AzaC-ის დამატებამ მნიშვნელოვნად გაზარდა IL-12-ის და IL-15-ის სეკრეცია და შეცვალა ენდოთელინის რეცეპტორების ექსპრესია. 5-AzaC-ის დამატების შედეგად, ასევე, გაიზარდა პროსტატის კიბოს უჯრედების მიერ სათესლეს კიბოს ანტიგენის ექსპრესია.

დადგენილია, რომ ეპიგენეტიკური მოდიფიკაცია 5-აზაციტიდინით და იმუნომოდულაცია ლენალიდომიდით აძლიერებს სიმსივნის იმუნოგენობას და დენდრიტული უჯრედების ფუნქციას. შესაბამისად, შესაძლებელია ეს ნაერთები ეფექტური იყოს პროსტატის კიბოს მკურნალობაში.

ВЫБОР СПОСОБА МИНИИНВАЗИВНОЙ ПАЛЛИАТИВНОЙ ДЕКОМПРЕССИИ ПРИ ЛЕЧЕНИИ БОЛЬНЫХ СО ЗЛОКАЧЕСТВЕННОЙ ОБСТРУКЦИЕЙ ЖЕЛЧЕВЫВОДЯЩИХ ПУТЕЙ НА ОСНОВЕ ИЗУЧЕНИЯ БИОХИМИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ЖЕЛЧИ

^{1,2}Быков М.И., ³Сепиашвили Р.И., ²Щава В.В., ²Гобаева С.Л., ¹Быков И.М., ¹Басов А.А.

¹Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Краснодар, Россия; ²ГБУЗ «Научно-исследовательский институт - Краевая клиническая больница №1 им. проф. С.В. Очаповского» Министерства здравоохранения Краснодарского края, Краснодар;

³Российский университет дружбы народов, Москва, Россия

В настоящее время миниинвазивные методы декомпрессии желчевыводящих протоков (ЖВП) являются обязательным звеном лечения больных с обструкцией желчных протоков злокачественного генеза. Эти методики эффективны и обеспечивают отличные результаты при минимальной операционной травме [1,10,19]. Предоперационную декомпрессию желчных путей следует проводить во всех случаях длительно существующей механической непроходимости ЖВП как можно в более ранние сроки после предварительной предоперационной подготовки. Сроки предоперационной подготовки и диагностического поиска определяются наличием таких жизненно опасных осложнений, как острый холангит и развитие явлений

печеночной недостаточности, так как только экстренно выполненное миниинвазивное вмешательство позволяет избежать неблагоприятный исход течения заболевания.

Все миниинвазивные методы желчной декомпрессии по направлению доступа к ЖВП можно условно разделить на антеградные чрескожно-чреспеченочные вмешательства, выполняемые с использованием рентгеноскопического и ультразвукового контроля, ретроградные транспапиллярные вмешательства с применением рентгеноскопического и эндоскопического оборудования и, реже применяемые, лапароскопически-ассистированные операции. По сей день не су-

ществует универсального способа миниинвазивного дренирования билиарного тракта; у каждого из этих методов имеются свои преимущества и недостатки, начиная от относительной простоты выполнения, низкого уровня послеоперационных осложнений и летальности, заканчивая необходимостью использования дорогостоящего оборудования и расходных материалов [4,9,12,18]. Выбор метода миниинвазивной декомпрессии обыкновенно зависит от таких факторов, как уровень препятствия оттоку желчи, наличие доступа к проведению дренирующего вмешательства, материально техническая и кадровая оснащенность лечебного учреждения. Из вышепредставленного следует, что лечение механической желтухи злокачественного генеза – сложная задача, требующая разностороннего подхода для получения оптимального результата.

С целью длительной паллиативной билиарной декомпрессии следует отдавать предпочтение вариантам миниинвазивных вмешательств с внутренним дренированием, имеющих определенные преимущества перед наружным желчеотведением и, прежде всего, обеспечивающих физиологичный транзит желчи в двенадцатиперстную кишку (ДПК) и лучшее качество жизни пациентов. На современном этапе развития эндоскопии именно ретроградные методы декомпрессии ЖВП являются предпочтительным звеном лечения больных с обструкцией желчных протоков злокачественной этиологии [2,23]. Рациональное применение таких транспапиллярных методов декомпрессии, как эндоскопическая папиллосфинктеротомия, баллонная дилатация и внутрипротоковое бужирование, назобилиарное дренирование и различные варианты эндобилиарного стентирования позволяют установить причину и уровень блока ЖВП, а также восстановить пассаж желчи в ДПК в 73-95% клинических наблюдений [11,21]. При этом эндоскопические методы декомпрессии ЖВП могут рассматриваться как способ первичного лечения в качестве подготовки к радикальному хирургическому лечению [8,17], так и в плане окончательного паллиативного вмешательства у инкурабельных больных и пациентов преклонного возраста с критическим анестезиологическим риском [7,20].

Среди недостатков эндоскопического ретроградного внутреннего дренирования ЖВП следует выделить высокую частоту поздних осложнений, таких как регулярные рецидивы механической желтухи и холангита в связи с обтурацией просвета стента микролитами. Эта отрицательная сторона характерна для любых билиарных стентов независимо от материала изготовления или способа их установки, однако сроки возникновения окклюзии значительно варьируют в зависимости от различных факторов [5,6,16]. Большинство исследователей пришли к выводу, что

после установки стента происходит покрытие его поверхности белково-бактериальной пленкой, состоящей из фибрина, коллагена, фибронектина и иммуноглобулина А, далее происходит отложение солей и микролитов на поверхности пленки, что в конечном итоге приводит к сужению просвета и обструкции эндопротеза [3,22]. В литературе недостаточно внимания уделяется проблемам определения выраженности метаболических нарушений в желчи, возникающих при обструкции ЖВП и отражающих глубину несостоятельности локальной системы неспецифической защиты организма, что могло бы значительно влиять на выбор декомпрессионного вмешательства.

Наибольший интерес в выборе той или иной модели эндопротеза представляют транспапиллярные дренирующие вмешательства у инкурабельных онкологических больных, так как риск развития рецидивной механической желтухи или необходимость плановых замен стентов требуют повторных госпитализаций, анестезий, определенных экономических затрат, что не приводит к увеличению продолжительности и улучшению качества жизни пациентов. До недавнего времени ведущим фактором, определяющим выбор метода паллиативной декомпрессии, в группе онкологических больных являлась ожидаемая продолжительность жизни, которая в основном, зависит от размера первичной опухоли, степени физикального статуса пациента по классификации ASA, а также генерализации онкологического процесса. При этом выбор способа билиарной декомпрессии и модели эндопротеза зачастую осуществляется эмпирически, не учитывая метаболический статус на местном уровне, прежде всего, в желчи.

Целью исследования явилось изучение основных метаболических нарушений на местном уровне (в желчи) у больных злокачественной обструкцией желчевыводящих протоков, выявление новых объективных диагностических критериев, определяющих выбор дренирующего вмешательства и подбор модели эндобилиарного стента.

Материал и методы. Лабораторные показатели, отражающие основные метаболические нарушения, изучены в трех различных группах больных: I группа (контрольная), которую составили пациенты без инструментальных данных, подтверждавших желчнокаменную болезнь и злокачественные новообразования органов билиопанкреатодуоденальной зоны (БПДЗ) (n=38); II группа, которую составили больные злокачественными новообразованиями органов БПДЗ без клинических и лабораторных проявлений холангита (n=39); III группа - больные злокачественными новообразованиями органов БПДЗ, осложненными острым холангитом (n=24). Для оценки интенсивности свободноради-

кального окисления в желчи использовали метод люминол-зависимой H₂O₂-индуцированной хемилюминесценции, максимум вспышки хемилюминесценции (МВХЛ). Площадь хемилюминесценции (ПХЛ) измеряли посредством хемилюминофестера ЛТ-01 по методике [14] и выражали в условных единицах (усл. ед.) и единицах площади (ед. пл.), соответственно. Определение антиокислительной активности (АОА) желчи проводили амперометрическим методом на анализаторе антиоксидантной активности («Яуза-01-ААА») по способу [13], по которому сначала при определенном потенциале (1,3 В) измеряли электрический ток, возникающий при окислении на поверхности рабочего электрода стандарта (аскорбиновая кислота в концентрации от 0,1 до 8,0 мг/л), на основании полученных данных выполняли построение калибровочного графика. Определение содержания холестерина (ХС) желчи проводили с помощью набора реактивов «Холестерин-22-Витал» (Витал Диагностикс СПб). Изучение общих липидов (ОЛ) желчи проводили с помощью набора реактивов «Общие липиды» (PLIVA-Lachema Diagnostika s.r.o.).

Для определения литогенности желчи разработан интегральный показатель (ИПЛ), включающий определение в желчи у обследуемого (i) показателей липидного обмена (ХС, ОЛ) и состояния прооксидантно-антиоксидантного баланса (АОА, МВХЛ и ПХЛ), позволяющий осуществлять комплексную оценку выраженности дисхолии [15], рассчитываемый по формуле:

$$\text{ИПЛ}_i = \left[\left(\frac{\text{ХС}_i}{\text{ХС}_k} \right) \cdot \left(\frac{\text{ПХЛ}_i}{\text{ПХЛ}_{Li}} \cdot \frac{\text{МВХЛ}_i}{\text{МВХЛ}_{Li}} \right) / \left(\frac{\text{ПХЛ}_k}{\text{ПХЛ}_{Lk}} \cdot \frac{\text{МВХЛ}_k}{\text{МВХЛ}_{Lk}} \right) \right] \cdot \left[\left(\frac{\text{ОЛ}_i}{\text{ОЛ}_k} \right) \cdot \left(\frac{K_i \cdot \text{АОА}_i}{\text{АОА}_{\text{vitC}_i}} \right) / \left(\frac{K_k \cdot \text{АОА}_k}{\text{АОА}_{\text{vitC}_k}} \right) \right]$$

где K_i и K_k – коэффициент разведения – кратность разведения пробы желчи обследуемого и пробы желчи, принятой за контроль, соответственно, при опреде-

лении АОА, и чем больше значение ИПЛ_i, тем выше степень литогенности желчи и соответственно риск развития холелитиаза.

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили в соответствии с методами, принятыми в вариационной статистике, с использованием программного обеспечения статистического анализа R (R Development Core Team, 2008, достоверным считали различие при p<0,05).

Результаты и их обсуждение. Анализ биохимических показателей на местном (в желчи) и системном (в крови) уровнях позволил установить у пациентов со злокачественными новообразованиями БПДЗ наличие выраженных в различной степени метаболических нарушений, прежде всего - дислипидемии и дисбаланса прооксидантно-антиоксидантной систем с преобладанием прооксидантных факторов. При этом, если полученные в результате анализа крови данные характеризовались значительной вариабельностью, что несколько затрудняло проведение диагностических мероприятий, то на местном уровне (в желчи) изменения таких биохимических субстратов как общие липиды, холестерин, антиокислительная активность, максимум вспышки хемилюминесценции и площадь вспышки хемилюминесценции носили достаточно закономерный характер (таблица 1). Наиболее существенные изменения прооксидантно-антиоксидантного баланса на системном и местном уровнях наблюдались в группах пациентов с развившимся воспалительными осложнениями (холангитом). Вышеизложенное характеризовалось, прежде всего, значительным повышением интенсивности свободно-радикального окисления в крови в III группе, у которых показатели МВХЛ были увеличены в сравнении с I группой (p<0,05) на 54,2%, а значения ПХЛ были выше, соответственно, в 1,7 раз. Установлено, что в крови и желчи во всех клинических группах наблюда-

Таблица 1. Показатели прооксидантно-антиоксидантной системы и липидного спектра в желчи у пациентов с механической желтухой (M±m)

Показатель	I группа контрольная (n = 38)	II группа без холангита (n = 39)	III группа с холангитом (n = 24)
МВХЛ, усл. ед.	1,92 ± 0,83	1,62 ± 0,51	2,96 ± 0,27
ПХЛ, ед. пл.	171,75 ± 7,3	207,30 ± 3,78*	289,31 ± 7,34*,#
АОА (• 10 ²), мг/л	0,61 ± 0,04	0,25 ± 0,01*	0,17 ± 0,02*,#
ОЛ, г/л	8,06 ± 0,14	3,47 ± 0,24	1,96 ± 0,49*
ХС, ммоль/л	2,99 ± 0,37	2,26 ± 0,23*	1,72 ± 0,36*
ТрГ, ммоль/л	0,66 ± 0,04	0,52 ± 0,01	0,48 ± 0,05

примечание: * – p<0,05 в сравнении с показателями I группы (контроль);
– p<0,05 в сравнении с показателями II группы

лось развитие дисбаланса в функционировании ферментного звена с превалированием дисмутазной активности над активностью каталазы и накоплением продуктов окислительной модификации. Наиболее закономерные изменения рассматриваемых биохимических субстратов выявлены именно в желчи, где отмечалось также повышение МВХЛ и ПХЛ преимущественно при воспалительных осложнениях, что сопровождалось снижением ее АОА, а также увеличением доли ОХС среди ОЛ (таблица 1), сопровождаясь нарастанием биохимической нестабильности желчи.

Средние значения полученного в проведенном исследовании интегрального показателя литогенности желчи у больных со злокачественной обструкцией ЖВП (IV группа – без развития холангита и V группа – с развитием холангита) в сравнении со средними значениями ИПЛ в контрольной I группе и группах больных с холедохолитиазом (II группа – без развития холангита и III группа – с развитием холангита) представлены на рисунке.

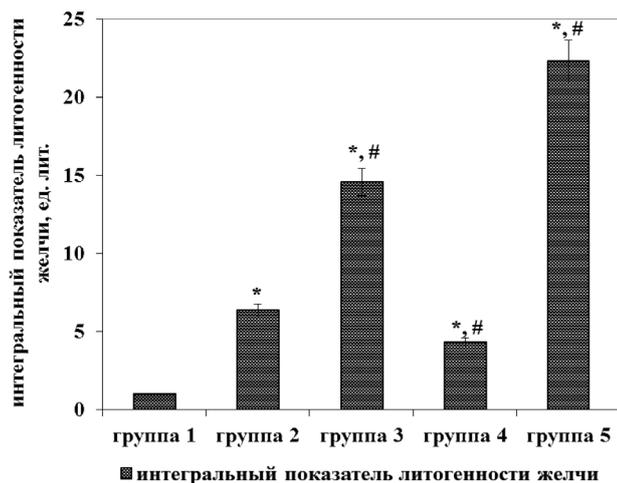


Рис. Изменение интегрального показателя литогенности желчи у пациентов с механической желтухой опухолевого генеза

примечание: * – $p < 0,05$ в сравнении с показателями I группы; # – $p < 0,05$ в сравнении с показателями II группы

Исследования выраженности метаболических нарушений на местном уровне, в основе которых лежит определение ИПЛ желчи, позволили выделить новые критерии выбора дренирующего вмешательства у больных с обструкцией ЖВП при необходимости длительной паллиативной декомпрессии. В наших исследованиях определяющим критерием выбора являлся показатель ИПЛ желчи у больных с холедохолитиазом (II группа), среднее значение которого составило 6,4 ед. лит. Выбор в качестве критерия оценки литогенности желчи в клинической практике средних значений ИПЛ именно у больных с холедо-

холитиазом (II группа) объясняется тем, что процесс холелитогеनेза является одной из ключевых причин инкрустации билиарных эндопротезов микролитами в отдаленном периоде; у пациентов этой группы наблюдались минимальные признаки воспалительных изменений в ЖВП, а также отсутствовало дополнительное системное влияние, характерное для групп больных с опухолевым поражением.

Выбор метода паллиативной декомпрессии в зависимости от полученных данных ИПЛ желчи был основан на собственных результатах анализа длительности функционирования различных моделей применяемых эндопротезов. Согласно полученным данным, о сроках функционирования или замены билиарных эндопротезов у больных со злокачественными новообразованиями БПДЗ установлено, что у полимерных стентов с обычным (стандартным) покрытием диапазон значений медианы составляет от 115,5 до 159,0 суток, у полимерных стентов с двойным покрытием – 198,0 суток, а у нитиноловых саморасширяющихся протезов – 390,0 суток. Диапазон длительности функционирования полимерных эндопротезов с обычным покрытием обоснован различными сроками работы этих стентов в зависимости от локализации опухоли.

Значение ИПЛ желчи, соотнесенное со значениями медиан сроков функционирования различных моделей эндопротезов, выявленных в нашем исследовании, легло в основу разработанного нами клинико-диагностического алгоритма выбора стентов для паллиативной декомпрессии и времени их плановой замены. При этом ожидаемая длительность функционирования эндопротезов может быть пропорциональна среднему значению ИПЛ желчи II группы. В соответствии с вышеизложенным и учетом соотношения риска инкрустации различных моделей стентов микролитами на фоне индивидуальных показателей ИПЛ желчи разработан определенный алгоритм выбора метода паллиативной декомпрессии, включающий четыре лечебно-диагностических модуля (таблица 2).

Согласно выработанному алгоритму у больных с ожидаемой продолжительностью жизни менее 6 месяцев, ретроградное эндопротезирование ЖВП полимерным стентом с обычным покрытием (диаметром 10–11,5 Fr) допустимо при значении ИПЛ менее 6,4 ед. лит., а при выявлении ИПЛ в диапазоне от 6,4 до 14,6 ед. лит. следует имплантировать пластиковый протез с двойным покрытием (диаметром не менее 10 Fr). Ретроградное или антеградное эндопротезирование ЖВП саморасширяющимся стентом следует выполнять у пациентов с ожидаемой продолжительностью жизни более 6 месяцев, а также при значении ИПЛ в диапазоне от 14,6 до 64 ед. лит.

Таблица 2. Критерии выбора метода паллиативной декомпрессии в зависимости от значений интегрального показателя литогенности желчи

Лечебно-диагностические модули	Значения ИПЛ, (ед. лит.) (кратность средних значений показателя II группы)	Средний срок функционирования стентов, (сутки)	Методы паллиативной билиарной декомпрессии
1	Менее 6,4 (<1,0)	115,5–159,0**	Ретроградное эндопротезирование ЖВП полимерным стентом с обычным покрытием (диаметром не менее 10 Fr)
2	От 6,4 до 14,6 (от 1,0 до 2,2)	198,0	Ретроградное эндопротезирование ЖВП полимерным стентом с двойным покрытием (диаметром не менее 10 Fr)
3	От 14,6 до 64,0 (от 2,2 до 10,0)	390,0	Ретроградное или антеградное эндопротезирование ЖВП нити-оловым саморасширяющимся стентом
4	От 64,0 и более (от 10,0 и более)	Не определен	Антеградное наружно-внутреннее дренирование

примечание: * – оптимально применимый метод декомпрессии, не исключающий использование альтернативных методик дренирования ЖВП, рекомендуемых в последующих лечебно-диагностических модулях (2, 3, 4); ** – наличие диапазона длительности функционирования полимерных эндопротезов с обычным покрытием в первом лечебно-диагностическом модуле обосновано различными сроками работы этих стентов в зависимости от локализации опухоли

Таблица 3. Критерии прогнозирования приближенных сроков возможной обтурации стентов при первичном протезировании

Модель стента	Значение ИПЛ желчи (ед. лит.)	Сроки плановой госпитализации *	Рекомендации при плановых осмотрах и госпитализациях у больных с функционирующими полимерными стентами
Стент ** (стандартное покрытие)	Менее 6,4	3–4 месяца	Санация билиарного эндопротеза с забором желчи, определением ее ИПЛ и решением вопроса о необходимости замены стента согласно выработанному алгоритму
Стент ** (стандартное покрытие)	Более 6,4	До 2 месяцев	Решение вопроса о необходимости двухэтапного ведения с санацией ЖВП через устанавливаемый НБД и замена стента согласно выработанному алгоритму
Стент ** (двойное покрытие)	Менее 6,4	До 6 месяцев	Решение вопроса о необходимости двухэтапного ведения с санацией ЖВП через устанавливаемый НБД и замена стента согласно выработанному алгоритму
Стент ** (двойное покрытие)	Более 6,4	До 3 месяцев	Санация билиарного эндопротеза с забором желчи, определением ее ИПЛ и решением вопроса о необходимости замены стента согласно выработанному алгоритму

примечание: * – при условии динамического наблюдения за пациентами; ** – диаметр ≥ 10 Fr

Целесообразность применения методики антеградного наружно-внутреннего дренирования, вне зависимости от ожидаемой продолжительности жизни у пациентов со значением ИПЛ, превышающим 64 ед. лит., определена возможностью периодической санации ЖВП и протеза в амбулаторных условиях из-за высокого риска его обтурации и развития гнойных осложнений.

Учитывая полученные в ходе работы результаты, которые доказали непосредственное влияние выраженности воспаления в ЖВП на формирование ИПЛ желчи, считаем обоснованным применение двухэтапной тактики лечения больных, поступающих в стационар с клинико-инструментальными и эндоскопическими признаками гнойного холангита. В такой ситуации первым этапом устанавливается назобилиарное дре-

нирование (НБД) с целью дозированной декомпрессии, местного лечения холангита и затем забора желчи для определения в ней ИПЛ, на основании значения которого проводится выбор оптимальной модели эндопротеза, имплантируемого на втором этапе.

Возможность с помощью комплексной оценки определять ИПЛ желчи и степень снижения в ней антиоксидантных факторов позволила прогнозировать приближенные сроки обтурации билиарных стентов. Поэтому в группе больных с отсутствием клинико-инструментальных данных и макроскопических признаков острого гнойного холангита, которым обычно одноэтапно выполнялось эндопротезирование, интраоперационно осуществлялся забор желчи через стерильный катетер для проведения ее биохимического анализа и определения ИПЛ с целью обоснования рекомендаций сроков плановой госпитализации для решения вопроса о необходимости замены или санации установленного стента (таблица 3). При одномоментной установке нитиновых саморасширяющихся стентов динамические плановые осмотры должны проводиться с учетом клинической ситуации и индивидуальных значений ИПЛ желчи, однако не менее одного раза в шесть месяцев.

Заключение. Таким образом, возможность исследования выраженности метаболических нарушений при различных заболеваниях БПДЗ на местном уровне (в желчи) на основании определения ее ИПЛ позволила оптимизировать алгоритм выбора метода декомпрессии ЖВП, направленного на предупреждение ранней обтурации эндопротезов. Включение дополнительных критериев оценки дисхолии позволило обеспечить адекватную тактику ведения больного в послеоперационном периоде, а также обосновать необходимость проведения лечебных мероприятий, направленных на профилактику отдаленных осложнений эндобилиарного стентирования. Мультидисциплинарный подход к анализу патологических процессов, протекающих у больных с механической желтухой, позволяет предположить, что повышение эффективности диагностических мероприятий, выявляющих дисхолию и определяющих риск литогенеза путем комплексной оценки метаболических нарушений на местном уровне по показателям липидного обмена и прооксидантно-антиоксидантного баланса в желчи, позволит, в том числе, осуществлять оптимальный выбор билиарной декомпрессии и своевременно проводить полноценную и, при необходимости, длительную коррекцию холестаза.

Работа выполнена при поддержке Министерства здравоохранения Российской Федерации от 28.01.2015 г. ч. 1, раздел 1.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бекбауров С.А., Глебов К.Г., Котовский А.Е. Роль дозированной декомпрессии желчных протоков в лечении острого гнойного холангита. Эндоскопич. хирургия. 2012; 2: 21–25.
2. Басов А.А., Барышев М.Г., Быков И.М., Павлюченко И.И., Джимаков С.С., Сепиашвили Р.И. Воздействие воды с модифицированным составом на интенсивность свободорадикальных процессов в эксперименте на лабораторных животных. Аллергология и иммунология. 2012; 4(12): 314–320.
3. Глебов К.Г., Котовский А.Е., Дюжева Т.Г. Критерии выбора конструкции эндопротеза для эндоскопического стентирования желчных протоков. Анналы хирургической гепатологии. 2014; 19(2): 55–65.
4. Дюжева Т.Г., Савицкая Е.Е., Котовская А.Е., Батин М.А. Биодegradуемые материалы и методы тканевой инженерии в хирургии желчных протоков. Анналы хирургической гепатологии. 2012; 1: 94–99.
5. Израйлов Р.Е., Кулезнева Ю.В., Гурченкова Е.Ю. Внутреннее желчеотведение у больных раком органов билиопанкреатодуоденальной зоны. Тихоокеанский мед. журн. 2011; 4: 66–70.
6. Калаханова Б.Х. Современная роль антерадного проезирования желчных протоков в разрешении механической желтухи. Мед. вестн. Башкортостана. 2014; 9(6): 103–105.
7. Прудков М.И., Ковалевский А.Д., Натрошвили И.Г. Эндоскопические, чресфистульные и трансабдоминальные вмешательства при холангиолитиазе. Анналы хирургической гепатологии. 2013; 18(1): 42–53.
8. Хромов В.В. Возможности различных методов лечения механической желтухи, обусловленной опухолью органов билиопанкреатодуоденальной зоны. Клинич. эндоскопия. 2012; 1(32): 24–33.
9. Хрусталева М.В., Шатвердян Д.Г., Годжелло Э.А. Эндоскопическое дуоденобилиарное дренирование в лечении опухолевых стенозов панкреатобилиарной зоны. Клинич. и эксперим. хирургия. журн. им. акад. Б.В. Петровского. 2014; 3: 90–98.
10. Шаповальянц С.Г., Ардасенов Т.Б., Паньков А.Г. Нерешенные вопросы лечения холедохолитиаза. Вестн. хирургии им. И.И. Грекова. 2011; 170(6): 98–102.
11. Шахбазян О.Г., Касумян С.А. Декомпрессия билиарного тракта в лечении больных механической желтухой опухолевого генеза. Анналы хирургической гепатологии. 2013; 18(1): 78–83.
12. Шевченко Ю.Л., Карпов О.Э., Ветшев П.С. Применение саморасширяющихся стентов при механической желтухе опухолевого генеза. Вестн. нац. медико-хирургич. центра им. Н.И. Пирогова. 2014; 9(2): 30–34.
13. Baron T.H., Saleem A. Intraductal electrohydraulic lithotripsy by using SpyGlass cholangioscopy through a colonoscope in a patient with Roux-en-Y hepaticojejunostomy. Gastrointestinal Endoscopy. 2010; 71(3): 650–651.

14. Basov A.A., Bykov I.M. Comparative characteristic of antioxidant capacity and energy content of some foods. *Voprosy Pitaniia*. 2013; 82(3): 77–80.
15. Basov A.A., Bykov I.M. Change of blood antioxidant capacity of experimental animals during nutritional correction under oxidative stress. *Voprosy Pitaniia*. 2013; 82(6): 75–81.
16. Bykov M.I., Basov A.A. Change of parameters in prooxidant-antioxidant bile system in patients with the obstruction of bile-excreting ducts. *Medical news of North Caucasus*. 2015; 10(2): 131–135.
17. Costamagna G., Pandolfi M. Endoscopic stenting for biliary and pancreatic malignancies. *J. Clin. Gastroenterol.* 2004; 38: 59–67.
18. Decjer C. Biliary metal stents are superior to plastic stents for pre-operative biliary decompression in pancreatic cancer. *Surg. Endosc.* 2011; 25: 2634–2637.
19. Dhir V. Multicentre comparative evaluation of endoscopic placement of expandable metal stents for malignant distal CBD obstruction by ERCP or EUS-guided approach in patients with or without duodenal stenosis. *United Eur. Gastroenterol. J.* 2014; 2(5S): 141.
20. Dumonceau J.M. Biliary stenting: indications, choice of stents and results. *ESGE Clinical Guideline. Endoscopy*. 2012; 44: 277–298.
21. Ferreira L.E., Baron T.H. Endoscopic stenting for palliation of malignant biliary obstruction. *Expert. Rev. Med. Devices*. 2010; 7: 681–691.
22. Hair C.D., Sejjal V.D. Future developments in biliary stenting. *Clinical Experim. Gastroenterology*. 2013; 6: 91–99.
23. Huijbregtse I., Fockens P. Plastic biliary stents for malignant biliary diseases. *Gastrointestinal endoscopy clinics of North America*. 2011; 21(3): 435–445.
24. Park S.Y. The safety and effectiveness of endoscopic biliary decompression by plastic stent placement in acute suppurative cholangitis compared with nasobiliary drainage. *Gastrointest. Endosc.* 2008; 68: 1076–1080.

SUMMARY

SELECTION OF MINI-INVASIVE PALLIATIVE DECOMPRESSION METHOD IN PATIENTS WITH MALIGNANT OBSTRUCTION OF BILIARY DUCTS BASED ON THE STUDY OF BIOCHEMICAL BILE INDEXES

^{1,2}Bykov M., ³Sepiashvili R., ²Shchava V.,
³Gobayeva S., ¹Bykov I., ¹Basov A.

¹Kuban state medical university, Krasnodar, Russia; ²Scientific research institute of the Ochapovsky regional clinic of the ministry of Public health of Russia, Krasnodar, Russia; ³Peopels Friendship University of Russia, (RUDN University), Moscow, Russia

The article gives our own experience in the determination and study of additional laboratory criteria (total

lipids, cholesterol, maximum and area chemiluminescence, antioxidant activity) at the local level (in bile) in patients with bile duct obstruction of malignant etiology. Constellation of metabolic disorders allowed to propose an original method for determining the lithogenicity of bile (integral indicator of lithogenicity). The obtained data made it possible to justify the need to assess the degree of metabolic disturbances in bile, on the basis of which it is possible to predict the risk of lithogenesis and the duration of stent operation, which in turn helped optimize the algorithm for choosing the method of bile ducts decompression aimed at preventing early obturation of endoprosthesis.

Keywords: mechanical jaundice, endobiliary stenting, integral indicator of bile lithogenicity.

РЕЗЮМЕ

ВЫБОР СПОСОБА МИНИИНВАЗИВНОЙ ПАЛЛИАТИВНОЙ ДЕКОМПРЕССИИ ПРИ ЛЕЧЕНИИ БОЛЬНЫХ СО ЗЛОКАЧЕСТВЕННОЙ ОБСТРУКЦИЕЙ ЖЕЛЧЕВЫВОДЯЩИХ ПУТЕЙ НА ОСНОВЕ ИЗУЧЕНИЯ БИОХИМИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ЖЕЛЧИ

^{1,2}Быков М.И., ³Сепиашвили Р.И., ²Щава В.В.,
³Тобаева С.Л., ¹Быков И.М., ¹Басов А.А.

¹Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Краснодар, Россия; ²ГБУЗ «Научно-исследовательский институт - Краевая клиническая больница №1 им. проф. С.В. Очаповского» Министерства здравоохранения Краснодарского края, Краснодар; ³Российский университет дружбы народов, Москва, Россия

Целью исследования явилось изучение основных метаболических нарушений на местном уровне (в желчи) у больных злокачественной обструкцией желчевыводящих протоков, выявление новых объективных диагностических критериев, определяющих выбор дренирующего вмешательства и подбор модели эндобилиарного стента. Конstellация метаболических нарушений позволила предложить оригинальный способ определения литогенности желчи (интегральный показатель литогенности). Полученные данные позволили обосновать необходимость оценки степени метаболических нарушений в желчи, на основании которых можно прогнозировать риск литогенеза и сроки функционирования стентов, что, в свою очередь, позволяет оптимизировать алгоритм выбора метода декомпрессии желчевыводящих протоков, направленного на предупреждение ранней обтурации эндопротезов.

რეზიუმე

მინინგაზიური პალიატიური დეკომპრესიის მეთოდის შერჩევა სანაღველე გზების ავთვისებიანი ობსტრუქციის დროს ნაღველის ბიოქიმიური პარამეტრების შესწავლის საფუძველზე

¹მ. ბიკოვი, ³რ. სეფიაშვილი, ²გ. შნავა, ²ს. გობაევა, ¹ი. ბიკოვი, ¹ა. ბასოვი

¹რუსეთის ფედერაციის ჯანმრთელობის დაცვის სამინისტროს უმაღლესი განათლების ფედერალური სახელმწიფო საბიუჯეტო საგანმანათლებლო დაწესებულება „ყუბანის სახელმწიფო სამედიცინო უნივერსიტეტი“, კრასნოდარი; ²ჯანმრთელობის დაცვის სახელმწიფო საბიუჯეტო დაწესებულება კრასნოდარის მხარის ჯანმრთელობის დაცვის სამინისტროს “სამეცნიერო-კვლევითი ინსტიტუტი - ს. ვ. ოჩაპოვსკის სახ. №1 სამხარეო კლინიკური საავადმყოფო“, კრასნოდარი; ³რუსეთის ხალხთა მეგობრობის უნივერსიტეტი, მოსკოვი, რუსეთი

კვლევის მიზანს წარმოადგენდა ნაღველში ძირითადი მეტაბოლური დარღვევების შესწავლა ავადმყოფებში სანაღველე გზების ავთვისებიანი ეტიოლოგიის ობსტრუქციით; ახალი ობიექტური დიაგნოსტიკური კრიტერიუმების გამოვლენა ენდობილიარული სტენტის მოდელის შერჩევის მიზნით. მეტაბოლური დარღვევების კონსტელაციამ განაპირობა ნაღველის ლითოგენობის (ლითოგენობის ინტეგრალური მაჩვენებელი)

განსაზღვრის ორიგინალური მეთოდის შემუშავება. მიღებულმა მონაცემებმა ცხადყო ნაღველის მეტაბოლური დარღვევის ხარისხის დადგენის აუცილებლობა ლითოგენეზის რისკის და სტენტების ფუნქციონირების ვადების განსაზღვრისათვის, რამაც, თავის მხრივ, უზრუნველყო სანაღველე გზების დეკომპრესიის ალგორითმის ოპტიმიზირება ენდოპროთეზების ადრეული ობსტრუქციის თავიდან აცილების მიზნით.

LATENT TUBERCULOSIS POTENTIAL BIOMARKERS: REACTIVATION OF INFECTION

Pantsulaia I., Kikodze N., Chikovani T.

Tbilisi State Medical University, V.I. Bakhutashvili Institute of Medical Biotechnology, Georgia

Active and Latent Tuberculosis

Tuberculosis, although a curable disease, continues to be one of the most important infectious causes of death worldwide. Despite substantial investments and progress made in expansion of directly observed therapy short course (DOTS) strategy, improved treatment completion rates and inadequate case detection remains a major obstacle for global control of Tuberculosis. TB still causes 1.5 million deaths and 10 million new cases per year [31]. Georgia has one of the highest TB burdens in Eastern Europe. According to the World Health Organization global report (<http://www.euro.who.int/data>) an approximately 3850 TB cases were identified in Georgia, 6.8% of which were multi-drug resistant. The causative organism, *Mycobacterium tuberculosis*, has been estimated to effect nearly 2 billion people worldwide but only 10% of these infected individuals will develop the active disease within 1–2 years. In rest of population, *M. tuberculosis* will enter the dormant phase and likely will have a lifelong persistence with no signs of disease. These individuals are carriers of the pathogen and

represent slow-release reservoirs. Latent carriers harbor a 2–23% lifetime risk of developing reactivation tuberculosis due to concomitant infections, malnutrition or other factors [10,11,18,21,23,40]. After exposure to an active case of TB—especially, intensive and durable exposure to a highly infectious index case with cavitary TB and poor cough etiquette - LTBI may ensue. Young individuals and those with reduced protective immunity stand the highest chance of developing TB following exposure: pregnant women, those with HIV coinfection, but to a lesser degree also those with diabetes, etc. [41].

Latent infection can only be reduced by firstly identifying those who are infected. Once people with latent infection have been identified they can be given preventative therapy, which will eliminate the *M. tuberculosis* and, consequently, prevent conversion to active disease through elimination of the onward progression of the disease [18,23]. Despite an international strategy implemented in over 182 countries worldwide, the correct diagnosis of TB stages in patients

remains one of the main problems and the lack of the accurate diagnosis leads to an unacceptable burden of human suffering and to a waste of precious resources in poor countries [1,2,14,15].

Tuberculosis Immunology: Cytokine and immune cells

Bacterial persistence and latency that are crucial components for *M. tuberculosis* virulence has been proven to be extremely difficult to diagnose. The latent bacterium does not replicate and, therefore, cannot be cultured and identify *in vitro*. The only possible method to diagnose the dormant *M. tuberculosis* infection is by detecting the host immunological memory to this pathogen. In order to adequately tailor diagnostic tests for TB, it is essential to understand the interplay between *M. tuberculosis* and the immune system that leads to development of latent infection [7].

M. tuberculosis has shown to be capable altering the cytokine balance during host infection by modulating expression of both inflammatory and anti-inflammatory molecules and cells [7-9,13,22]. Pathogen that gains entry to the host through the respiratory tract is preferentially phagocytized by alveolar monocytes and tissue macrophages. Once ingested by macrophages, cytokines such as IL-12, IL-23, IL-7, IL-15 and TNF- α are secreted and several T-cell populations are activated. T cells produce the effector cytokine IFN- γ , which activates macrophages in conjunction with TNF- α for efficient killing of intracellular bacteria [12,29]. The mycobactericidal effector mechanisms are actively suppressed through CD4⁺ Th2 cells, producing immunosuppressive cytokines such as IL-4, and CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ regulatory T (Treg) cells producing IL-10 and TGF- β [8,17]. In addition, CD8⁺ cytotoxic T cells can eliminate intracellular mycobacteria through granulysin and perforin-mediated pathways. A new subset of T helper cells called Th17 cells, that are produced in the presence of IL-23 and are characterized by production of IL-17, have identified as the important modulators of inflammation and recall memory responses during *M. tuberculosis* infection [3,16,30]. Th17 cells can recruit neutrophils, monocytes, CD4⁺ T cells producing IFN- γ , and stimulate chemokine expression. However, it has been shown that IFN- γ can suppress IL-17 producing Th17 cells. There is a complex cross-regulation of Th1, Th2, Th17 and Treg cell responses during *M. tuberculosis* different phases of infection and the precise role of individual responses in protective immunity remain controversial. There is no gold standard for the diagnosis of latent TB infection (LTBI). Tuberculin skin test (TST) is the most used screening method for diagnosis both latent tuberculosis infection and active tuberculosis infection (ATBI). However, the skin induration, caused by the sequential cutaneous infiltration of neutrophils, macrophages and lymphocytes including Treg cells, does not necessarily indicate the presence of viable *M. tuberculosis* in the tissues of asymptomatic individuals [32]. This method can also lead to the false positive results

due to prior vaccination with Bacillus Calmette Guérin (BCG) or non-tuberculous mycobacterium infection.

Immune reactions and Biomarkers in latent tuberculosis

Quantitative and relatively specific TB antigen-driven (ESAT-6, CFP-10, TB 7.7) T cell responses using peripheral blood mononuclear cells (PBMC) have been investigated for their utility in diagnosing TB infection (IGRA - Interferon- release assay) [5,6]. The IGRA are more specific and correlate well with the magnitude of exposure to *M. tuberculosis*. However, an important limitation of these assays is that, similarly to TST, they measure T-cell priming and not the viable bacterium. In addition, although IGRA are useful for the diagnosis of LTBI in low-burden settings, they cannot be used to distinguish LTBI from active disease using PBMC or whole blood. These assays can diagnose the active TB when using cells from the site of disease such as lung and cerebrospinal fluid. As an alternative approach, the assessment of expression levels of multiple cytokines likely will provide more effective results than reliance on a single marker.

Petruccioli et al [26] show that the quality of the T lymphocyte immune response to *M. tuberculosis* antigens is also heterogeneous among LTBI subjects. The subgroup of LTBI subjects with a positive QFT test presents a similar profile of T lymphocyte response to the latency antigen HBHA than patients with TB disease, characterized by a high frequency of TNF- α single⁺ CD4⁺ T lymphocytes. In contrast, the QFT- LTBI subgroup was characterized by a dominance of IFN- γ single⁺CD4⁺ T lymphocytes.

The IFN- γ -induced protein (IP-10) assay has been shown to be more sensitive assay than IFN- γ for detection of *M. tuberculosis* [20,25,26,28,39] has shown that measuring the multiple host marker (IFN- γ , IL-4 and IL-4 δ 2) expressions *ex vivo*, without *in vitro* antigen stimulation, can provide useful insight into the progression of TB disease. In fact, it represents the ongoing immune and existing effector response. The potential downside of this method is that these responses may not be the TB specific [38,39]. The data from Chegou and colleagues suggest that active TB can be accurately differentiated from LTBI by utilizing adaptations of the commercial Quantiferon test. This assay is based on detection of EGF, sCD40L, MIP-1 β , VEGF, TGF- α or IL-1 α in supernatants of antigen stimulated PBMC cells [6,26]. Recently, Stern et al [34] have reported the molecular signature of active TB infection that differed from the latent TB. In particular, genes encoding IL-7, IL-2, IL-6, and IFN-1 interleukins and IL-1R2 and IL-18R1 interleukin receptors were up-regulated in active TB patients and absent in LTBI individuals. While IL-17 and IGFBP3 genes showed significant expression in LTBI compared to active TB cases, IL-15 was down-regulated in LTBI, but not during active TB infection. The gene networking studies, covering the cellular immune responses during *M. tuberculosis* pathogenesis at different stages of infection,

can be used for identification of specific TB biosignatures driven by the host-pathogen interaction [37].

Moreover, Won et al [41] investigate the three unstimulated biomarkers (IL-8, IL-13, and VEGF) and 5 Mtb-specific biomarkers (IFN- γ , IL-2, IL-3, IP-10, and VEGF) were significantly different between active TB and non-active TB groups. They found that combinations of three cytokine biomarkers resulted in the accurate prediction of 92.1-93.7% of Mtb-infected cases and 92.3-100% of HCs, respectively. Moreover, combinations of five biomarkers accurately predicted 90.9-100% of active TB cases and 80-100% of LTBI subjects, respectively. In discriminating between active TB and non-active TB regardless of QFT results, combinations of six biomarkers predicted 79.2-95.8% of active TB cases and 67.9-89.3% of non-active TB subjects. These data suggest that combinations of whole blood Mtb antigen-dependent cytokines could serve as new biomarkers to determine TB disease states. Especially, VEGF is highlighted as a key biomarker for reflecting active TB, irrespective of stimulation.

Concerning the qualitative differences in immune responses observed between TB disease and LTBI, conflicting findings were previously reported, particularly on the role of IFN- γ +TNF- α +IL-2+ triple positive T cells, which has been proposed as a hallmark of TB disease [27], as well as of LTBI [19]. In addition, recent vaccine trials have revealed that these multifunctional triple positive cells not necessarily offer protection in humans [33,35].

Although many studies investigate the TB biomarker, only handfuls were identified which have been clinically validated and are associated with risk of TB or progression of disease. The longitudinal cohort studies is required with careful clinical characterization of participants into TB infection and disease groups to validate the accuracies and the cut-off values of the markers for active and latent TB diagnosis. Moreover, promising biomarkers and biomarker signatures which can distinguish various stages within latency are urgently needed in order to prioritize those LTBI subjects with the highest risk to reactivate the infection as the primary target population for preventive therapy.

REFERENCES

1. Athar MT, Ullah Z. Current approaches and future prospects of nanomedicines in tuberculosis therapy. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov.* 2017 Apr 25.
2. Athar MT, Ullah Z. Current approaches and future prospects of nanomedicines in tuberculosis therapy. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov.* 2017 Apr 25.
3. Babu S, Bhat SQ, Kumar NP, et al. Regulatory T cells modulate Th17 responses in patients with positive tuberculin skin test results // *J Infect Dis.* 2010; 201(1):20-31.
4. Cardona PJ. The Progress of Therapeutic Vaccination with Regard to Tuberculosis // *Front Microbiol.* 2016, 7:1536.
5. Cattamanchi A, Ssewenyana I, Davis JL et al. Role of interferon-gamma release assays in the diagnosis of pulmonary tuberculosis in patients with advanced HIV infection // *BMC Infect Dis.* 2010, 10:75.
6. Chegou NN, Black GF, Kidd M et al. Host markers in QuantiFERON supernatants differentiates active TB from latent TB infection: preliminary report // *BMC Pulm Med.* 2009; 9:21
7. Cliff JM, Kaufmann SH, McShane H, van Helden P, O'Garra A. The human immune response to tuberculosis and its treatment: a view from the blood // *Immunol Rev.* 2015, 264(1):88-102.
8. da Silva MV, Tiburcio MG, Machado JR, Silva DA, Rodrigues DB, Rodrigues V, Oliveira CJ. Complexity and Controversies over the Cytokine Profiles of T Helper Cell Subpopulations in Tuberculosis // *J Immunol Res.* 2015, 2015:639107.
9. DjobaSiawaya JF, Chegou NN, van den Heuvel MM et al. Differential cytokine/chemokines and KL-6 profiles in patients with different forms of tuberculosis // *Cytokine.* 2009; 47(2):132-6.
10. Dodd CE, Schlesinger LS. New concepts in understanding latent tuberculosis // *Curr Opin Infect Dis.* 2017 Jun;30(3):316-321.
11. Dodd CE, Schlesinger LS. New concepts in understanding latent tuberculosis // *Curr Opin Infect Dis.* 2017; 30(3):316-321.
12. Doherty TM, Wallis RS, Zumla A. Biomarkers of disease activity, cure, and relapse in tuberculosis // *Clin Chest Med.* 2009; 30(4):783-96,
13. Domingo-Gonzalez R, Prince O, Cooper A, Khader SA. Cytokines and Chemokines in Mycobacterium tuberculosis Infection. *MicrobiolSpectr.* 2016 Oct;4(5).
14. Dunn JJ, Starke JR, Revell PA. Laboratory Diagnosis of Mycobacterium tuberculosis Infection and Disease in Children // *J ClinMicrobiol.* 2016, 54(6):1434-41.
15. Fox GJ, Dobler CC, Marais BJ, Denholm JT. Preventive therapy for latent tuberculosis infection-the promise and the challenges // *Int J Infect Dis.* 2017;56:68-76.
16. Garcia-Jacobo RE, Serrano CJ, Enciso Moreno JA, et al. Analysis of Th1, Th17 and regulatory T cells in tuberculosis case contacts // *Cell Immunol.* 2014 May-Jun;289(1-2):167-73.
17. He XY, Xiao L, Chen HB, et al. T regulatory cells and Th1/Th2 cytokines in peripheral blood from tuberculosis patients // *Eur J ClinMicrobiol Infect Dis.* 2010; 29(6):643-50.
18. Hunter RL. Tuberculosis as a three-act play: A new paradigm for the pathogenesis of pulmonary tuberculosis // *Tuberculosis (Edinb).* 2016, 97:8-17.
19. Hutchinson P, Barkham TMS, Tang W, Kemeny DM, Chee CBE, et al.(2015) Measurement of phenotype and absolute number of circulating heparin-binding hemagglutinin, ESAT-6 and CFP-10, and purified protein derivative antigen-specific CD4 T cells can discriminate active

from latent tuberculosis infection // *ClinVaccImmunol* 22: 200-212.

20. Lighter J, Rigaud M, Huie M, et al. Chemokine IP-10: an adjunct marker for latent tuberculosis infection in children // *Int J Tuberc Lung Dis.* 2009; 13(6):731-6.

21. Lin PL, Flynn JL. Understanding latent tuberculosis: a moving target // *J Immunol.* 2010; 185(1):15-22.

22. Luo J, Zhang M, Yan B, Zhang K, Chen M, Deng S. Imbalance of Th17 and Treg in peripheral blood mononuclear cells of active tuberculosis patients // *Braz J Infect Dis.* 2017; 21(2):155-161.

23. Lyadova IV, Panteleev AV. Th1 and Th17 Cells in Tuberculosis: Protection, Pathology, and Biomarkers // *Mediators Inflamm.* 2015, 2015:854507.

24. Nathan C, Barry CE 3rd. TB drug development: immunology at the table // *Immunol Rev.* 2015, 264(1):308-18.

25. Nemeth J, Winkler HM, Karlhofer F et al. T cells co-producing Mycobacterium tuberculosis-specific type 1 cytokines for the diagnosis of latent tuberculosis // *Eur Cytokine Netw.* 2010; 21(1): 34-9.

26. Petruccioli E, Scriba TJ, Petrone L, Hatherill M, Cirillo DM, Joosten SA, Ottenhoff TH, Denkinge CM, Goletti D. Correlates of tuberculosis risk: predictive biomarkers for progression to active tuberculosis // *EurRespir J.* 2016, 48(6):1751-1763.

27. Qiu Z, Zhang M, Zhu Y, Zheng F, Lu P, et al. (2012) Multifunctional CD4 T cell responses in patients with active tuberculosis. *Sci Rep* 2: 216.

28. Ruhwald M, Petersen J, Kofoed K, et al. Improving T-cell assays for the diagnosis of latent TB infection: potential of a diagnostic test based on IP-10. *PLoS ONE* 3:e2858. 2008

29. Ruhwald M, Ravn P. Biomarkers of latent TB infection // *Expert Rev Respir Med.* 2009; 3(4):387-401.

30. Serrano CJ, Castañeda-Delgado JE, Trujillo-Ochoa JL, et al. Regulatory T-cell subsets in response to specific Mycobacterium tuberculosis antigens in vitro distinguish among individuals with different QFT and TST reactivity // *ClinImmunol.* 2015 Apr;157(2):145-55.

31. Sgaragli G, Frosini M. Human Tuberculosis I. Epidemiology, Diagnosis and Pathogenetic Mechanisms // *Curr Med Chem.* 2016;23(25):2836-2873.

32. Simsek H, Alpar S, Ucar N, et al. Comparison of tuberculin skin testing and T-SPOT.TB for diagnosis of latent and active tuberculosis // *Jpn J Infect Dis.* 2010; 63(2):99-102.

33. Smits et al., Immunological Signatures Identifying Different Stages of Latent Mycobacterium tuberculosis Infection and Discriminating Latent from Active Tuberculosis in Humans // *J Clin Cell Immunol* 2015, 6:4

34. Stern JN, Keskin DB, Romero V et al. Molecular signatures distinguishing active from latent tuberculosis in peripheral blood mononuclear cells, after in vitro antigenic stimulation with purified protein derivative of tuberculin (PPD) or Candida: a preliminary report // *Immunol Res.* 2009; 45(1):1-12.

35. Tameris MD, Hatherill M, Landry BS, Scriba TJ, Snowden MA, et al. Safety and efficacy of MVA85A, a

new tuberculosis vaccine, in infants previously vaccinated with BCG: a randomised, placebocontrolled phase 2b trial // *Lancet* 2013, 381: 1021-1028.

36. Trauer JM, Moyo N, Tay EL et al. Risk of Active Tuberculosis in the Five Years Following Infection . . . 15%? // *Chest.* 2016; 149(2):516-25.

37. von Both U, Kaforou M, Levin M, Newton SM. Understanding immune protection against tuberculosis using RNA expression profiling // *Vaccine.* 2015 Sep 29;33(40):5289-93.

38. Wallis RS, Pai M, Menzies D et al. Biomarkers and diagnostics for tuberculosis: progress, needs, and translation into practice // *Lancet.* 2010; 375(9729):1920-37.

39. Walzl G, Ronacher K, Djoba Siawaya JF, Dockrell HM. Biomarkers for TB treatment response: challenges and future strategies // *J Infect.* 2008; 57(2):103-9

40. Wiker HG, Mustafa T, Bjune GA, Harboe M. Evidence for waning of latency in a cohort study of tuberculosis // *BMC Infect Dis.* 2010; 10:37.

41. Won EJ, Choi JH, Cho YN, et al. Biomarkers for discrimination between latent tuberculosis infection and active tuberculosis disease // *J Infect.* 2017; 74(3):281-293.

SUMMARY

LATENT TUBERCULOSIS POTENTIAL BIOMARKERS: REACTIVATION OF INFECTION

Pantsulaia I., Kikodze N., Chikovani T.

Tbilisi State Medical University, VI. Bakhutashvili Institute of Medical Biotechnology, Georgia

Tuberculosis continues to be one of the most important infectious causes of death worldwide. Despite substantial investments and progress made in expansion of directly observed therapy short course (DOTS) strategy, improved treatment completion rates and inadequate case detection remains a major obstacle for global control of Tuberculosis. The global case detection rate has increased from 28% to 60%.

However, it is estimated that approximately 50% of patients with tuberculosis are still not diagnosed or treated appropriately. The current diagnostics tests (tuberculin skin test and interferon-gamma release assays) poorly predict who will develop active disease and the therapeutic options available are not optimal for the scale of the intervention that may be required. In this article, we discuss a basis of current understanding of latent TB and highlight their biomarkers. We conclude that the identification new biomarkers which can distinguish various stages within latency are urgently needed in order to prioritize those LTB individuals with the highest risk to reactivate the infection.

Keywords: latent tuberculosis, interferon test, biomarkers.

РЕЗЮМЕ

ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ БИОМАРКЕРЫ ЛАТЕНТНОГО ТУБЕРКУЛЕЗА: РЕАКТИВАЦИЯ ИНФЕКЦИИ

Панцулаиа И.Дж., Кикодзе Н.О., Чиковани Т.И.

Тбилисский государственный медицинский университет, Институт медицинской биотехнологии им. Вл. Бахуташивили, Грузия

Несмотря на солидные инвестиции и достигнутый прогресс в экспансии лечения под непосредственным наблюдением и стратегии ускоренного курса амбулаторной терапии, туберкулез по сей день остается основной причиной смертности во всем мире. Число клинических случаев заболевания возросло от 28% до 60%. Кроме того, в большинстве случаев диагноз своевременно не установлен и не проведено соответствующее лечение.

Исходя из вышеизложенного, проведен анализ ретроспективной и текущей научной медицинской литературы по вопросам обнаружения новых иммунологических тестов и биомаркеров по выявлению латентного туберкулеза. В результате ознакомления с большим потоком информации по указанному вопросу авторы статьи считают необходимым проведение дальнейшей идентификации и оценку новых биомаркеров, которые позволят дифференцировать разные стадии латентного туберкулеза и обеспечат выявление групп с высоким риском реактивации инфекции.

რეზიუმე

ლატენტური ტუბერკულოზის შესაძლო ბიომარკერები: ინფექციის რეაქტივაცია

ი. ფანცულაია, ნ. კიკოდე, თ. ჩიქოვანი

თბილისის სახელმწიფო სამედიცინო უნივერსიტეტი, ვლ. ბახუტაშვილის სახელობის სამედიცინო ბიოტექნოლოგიის ინსტიტუტი, თბილისი, საქართველო

სადღეისოდ ტუბერკულოზის დროული და სწრაფი გამოვლენა ჯერ კიდევ მნიშვნელოვან პრობლემად რჩება. ჯანმრთელობის მსოფლიო ორგანიზაციის გაანგარიშებით, მსოფლიოში აქტიური ტუბერკულოზით ყოველწლიურად ავადდება 9 მილიონამდე ადამიანი და კვდება 2 მილიონზე მეტი. სავარაუდოდ, ტუბერკულოზით დაავადებულთა 50% ჯერ კიდევ არ არის დიაგნოსტირებული, ვინაიდან არსებული სადიაგნოსტიკო ტესტებით ვერ ხერხდება ლატენტური ტუბერკულოზის აქტიურ ფორმაში გადასვლის ადრეული გამოვლენა და, შესაბამისად, დაავადების პრევენცია. წინამდებარე სტატიაში მიმოხილულია თანამედროვე და რეტროსპექტიული ლიტერატურა ლატენტური ტუბერკულოზის დროს განვითარებული იმუნური პასუხის და მისი შესაძლო ბიომარკერების შესახებ. არსებულ მონაცემებზე დაყრდნობით, ავტორები დაასკვნიან, რომ ლატენტური ტუბერკულოზის სტადიების განმასხვავებელი ბიომარკერების იდენტიფიკაცია აქტუალურ საკითხს წარმოადგენს. მასზე დაყრდნობით შესაძლებელი იქნება ინფექციის რეაქტივაციის ყველაზე მაღალი რისკ-ჯგუფის ინდივიდების გამოვლენა ლატენტური ტუბერკულოზით დაავადებულთა შორის.

АНТИРЕТРОВИРУСНАЯ ТЕРАПИЯ И РИСК ПРОГРЕССИРОВАНИЯ ФИБРОЗА ПЕЧЕНИ У БОЛЬНЫХ, КОИНФИЦИРОВАННЫХ ВИЧ/ВГС

Аристанбекова М.С., Балмасова И.П., Малова Е.С., Сепиашвили Р.И.

Российский университет дружбы народов, Москва, Российская Федерация

Примерно 7 миллионов населения на планете хронически коинфицированы вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ) и вирусом гепатита С (ВГС) [18,19]. Исследование коинфекции ВИЧ/ВГС показало, что возбудители в значительной мере влияют друг на друга, усугубляя течение инфекционного процесса и отражая этапы борьбы человечества с указанными за-

болеваниями. Так, введение в клиническую практику 20 лет назад антиретровирусной терапии (АРТ) значительно повлияло на продолжительность жизни ВИЧ-инфицированных пациентов и вывело на первый план роль хронического гепатита С как наиболее частого коморбидного состояния и одну из главных причин прогрессирования заболевания в его наиболее тяже-

лую форму [8]. Медицинские работники столкнулись с фактом, что коинфекция ВИЧ/ВГС имеет не только более тяжелое течение, но и в значительной степени определяет летальность среди пациентов за счет быстрого прогрессирования поражения печени [21,24].

Воздействие антиретровирусной терапии на течение ВИЧ-инфекции сомнений ни у кого не вызывает, но ее влияние на прогрессирующее течение фиброза печени по сей день остается недостаточно изученным. Показано, что АРТ несколько снижает прогрессирование фиброза и риск цирроза печени, при этом по мере совершенствования АРТ изменяется и риск [16,17,22]. В частности, вызванное АРТ падение вирусной нагрузки ВИЧ оказывает дополнительное независимое влияние на повреждение печени и развитие ее декомпенсации [4,15].

Успешный ответ на АРТ среди коинфицированных пациентов ассоциирован с ростом клеточного иммунного ответа на ВГС, снижением уровня РНК ВГС и элиминацией данного возбудителя [12,14,22]. В связи с этим при коинфекции рекомендуется начинать АРТ уже на ранних стадиях ВИЧ-инфекции [9,23,25]. Начало лечения ВИЧ-инфекции перед значительным падением числа CD4+ Т-клеток позволяет сохранить ВГС-специфический иммунный ответ и предотвратить прогрессирование фиброза печени [6]. Применение АРТ у коинфицированных пациентов снижает возможность декомпенсации печени и развития летального исхода. Тем не менее, при коинфекции ВИЧ и ВГС летальность остается выше, чем у моноинфицированных пациентов [7], так как ВИЧ, как стало известно в последние годы, способствует репликации ВГС и ускоряет прогрессирование фиброза печени [11,20].

Ранее нами показано, что на прогрессирование фиброза печени у больных, коинфицированных ВИЧ/ВГС, в значительной мере влияет порядок инфицирования больных этими патогенами. Установлено, что прогрессирующий характер фиброз печени у коинфицированных пациентов принимает гораздо чаще в случаях, когда ВИЧ поступает в организм раньше, чем ВГС. Эта категория больных отнесена к группе высокого риска прогрессирования фиброза печени, в то время как пациенты, у которых первым патогеном служил ВГС, составили группу наименьшего риска. Группа высокого риска отличалась от группы наименьшего риска при коинфицировании ВИЧ/ВГС не только по частоте встречаемости прогрессирующего течения фиброза печени, но и достоверно более высокой вирусной нагрузкой ВИЧ, и более низким содержанием в крови числа CD3+CD4+ клеток [1,5].

В связи с вышеизложенным, целью данного исследования явилось определение характера влияния противовирусной терапии на развитие фиброза печени у больных, коинфицированных вирусом иммунодефи-

цита человека и вирусом гепатита С, в зависимости от порядка поступления патогенов в организм пациента.

Материал и методы. В течение 1 года под наблюдением находились 314 больных с верифицированным диагнозом коинфекции ВИЧ/ВГС. Около 67% больных были поражены генотипом 1b ВГС, 1% - генотипом 2a, а остальные - генотипом 3a. Все больные являлись потребителями наркотических средств.

Среди всех наблюдаемых больных у 106 установлен порядок инфицирования ВИЧ и ВГС, из них у 61 пациента первым поступившим патогеном был вирус иммунодефицита человека, а у 45 больных инфицирование ВИЧ происходило уже при имеющемся хроническом гепатите С, т.е. первым патогеном был ВГС. Разница во времени инфицирования разными патогенами составила от 1 года до 3 лет.

Всем пациентам в течение всего срока наблюдения проводилась транзитная эластометрия печени с определением стадии фиброзного процесса. Большинство обследованных пациентов в начале исследования находились на стадии отсутствия фиброзных изменений - 42%-47%, далее по частоте следует стадия начала фиброзного процесса - 17%-20%, затем - стадии F2 и F4 - 14%-15%, и наименьшее число больных было на стадии выраженного фиброза F3 - 8%. В течение года наблюдения происходило определенное изменение стадий фиброзного процесса как в сторону увеличения, так и в сторону снижения. При росте показателей эластометрии более, чем на 10%, фиброз печени считался прогрессирующим, при падении на эту же величину - регрессирующим, а остальные пациенты относились к группе стабильного течения фиброза печени.

В зависимости от проводимого лечения все наблюдаемые больные были подразделены на две группы: (1) получавшие антиретровирусную терапию (АРТ) - 151 больной; (2) не получавшие ни один из видов противовирусной терапии - 163.

В настоящем исследовании применялись следующие группы препаратов антиретровирусного действия: (1) нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы ВИЧ (ламивудин, никавир, вилдэк, эпивир, зиаген, вирозет, стаг), в том числе и комбинированные (комбивир, кивекса, вирокомб); (2) нунуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы ВИЧ (стокрин, интеленс, вирамун); (3) ингибиторы протеазы ВИЧ (калетра, телзир, презиста, ритонавир, реатаз, вирасепт); (4) ингибиторы интегразы ВИЧ (исентресс).

Препараты использовались в различных комбинациях. Чтобы анализируемые группы были референтными, рассматривались две категории комбинированного применения препаратов для АРТ: схема № 1 - только

ингибиторы обратной транскриптазы в различных сочетаниях - у 72 пациентов; схема № 2 - ингибиторы обратной транскриптазы в сочетании с ингибиторами протеазы или интегразы - у 79 пациентов.

Статистический анализ полученных результатов проводился с использованием пакета статистических программ SPSS, версия 21.

Результаты и их обсуждение. В процессе исследования, прежде всего, осуществлялось сопоставление двух групп - при проведении и в отсутствие антиретровирусной терапии.

Статистическая обработка осуществлялась методом однофакторного дисперсионного анализа (ONE WAY ANOVA), позволяющего проводить сопоставление распределения частоты встречаемости каждого варианта течения фиброза печени в сравниваемых группах с определением критерия Фишера и его достоверности. Результаты такого исследования представлены в таблице 1.

Как показывают результаты статистической обработки, взаимосвязь между приемом антиретровирусной терапии и характером течения фиброзного процесса

оказалась высокодостоверной. В случаях, когда больные коинфекцией ВИЧ и ВГС не получали АРТ, у них в 1,3 раза чаще отмечалось прогрессирующее течение фиброза печени и в 1,8 раза реже - регрессирующее.

Учитывая высокую степень влияния АРТ на течение фиброза печени, была реализована попытка определить, какая схема лечения оказывает наибольшее воздействие на фиброзный процесс. Результаты анализа взаимосвязи между схемой лечения и течением фиброза печени представлены в таблице 2.

Данный фрагмент исследований позволил выявить следующую закономерность. В случаях, когда для АРТ использовались только препараты ингибиторов обратной транскриптазы, частота встречаемости прогрессирующего течения фиброза печени была в 2,2 раза выше, чем в случае сочетания ингибиторов обратной транскриптазы и протеазы или интегразы. Более того, регрессирующее течение в первом случае наблюдалось в 2,5 раза реже, чем во втором.

Таким образом, судя о взаимосвязи АРТ и течения фиброза печени, можно утверждать, что к группе риска прогрессирующего фиброза следует отнести не только пациентов с отсутствием АРТ, но и коинфицированных

Таблица 1. Сравнительный анализ характера течения фиброза печени на фоне антиретровирусной терапии у больных, коинфицированных ВИЧ и ВГС

Течение фиброза печени	Частота встречаемости		ONE WAY ANOVA	
	Проводилась АРТ n=151, абс. (%)	АРТ не проводилась n=163, абс. (%)	F	p
Прогрессирующее течение, n = 114	48 (31,8)	66 (40,5)	91,023	<0,001*
Стабильное течение, n = 121	54 (35,8)	67 (41,1)		
Регрессирующее течение, n = 79	49 (32,4)	30 (18,4)		

примечание: n - число больных в группе; F - критерий Фишера, p - вероятность различий в распределении данных по группам; * - достоверность различий при p<0,05

Таблица 2. Характер течения фиброза печени в зависимости от схемы антиретровирусной терапии у больных, коинфицированных ВИЧ и ВГС

Течение фиброза печени	Частота встречаемости		ONE WAY ANOVA	
	Схема АРТ № 1 n=72, абс. (%)	Схема АРТ № 2 n=79, абс. (%)	F	p
Прогрессирующее течение, n=48	32 (44,4)	16 (20,2)	8,624	<0,001*
Стабильное течение, n=54	27 (37,5)	27 (37,5)		
Регрессирующее течение, n=49	13 (18,1)	36 (45,5)		

примечание: n - число больных в группе; F - критерий Фишера, p - вероятность различий в распределении данных по группам; * - достоверность различий между группами при p<0,05

больных, у которых для лечения ВИЧ-инфекции использовались только препараты из группы ингибиторов обратной транскриптазы.

Исходя из вышеизложенного, весьма интересно изучить соответствие течения фиброза печени при разных схемах антиретровирусной терапии порядку их инфицирования вирусами иммунодефицита человека и гепатита С. Результаты анализа этих данных представлены на рис.

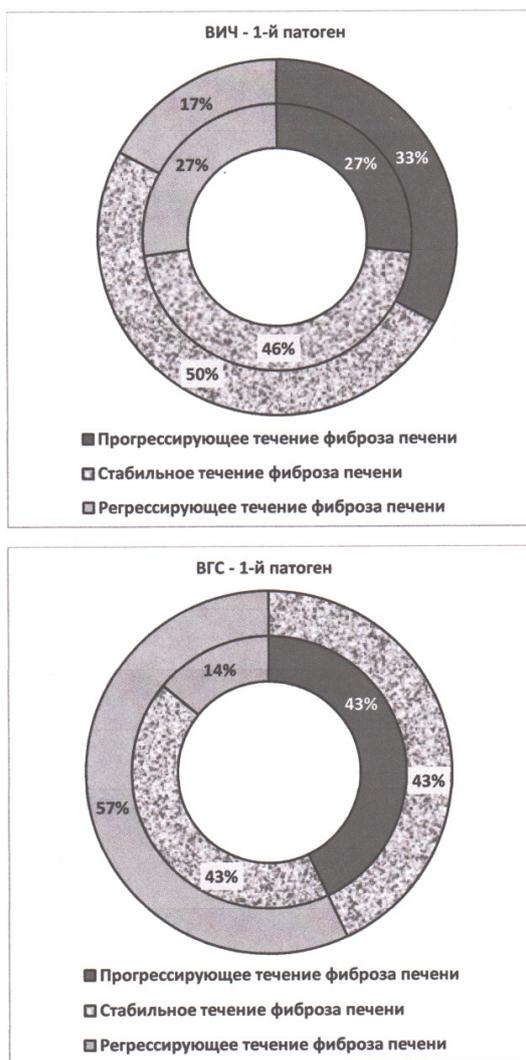


Рис. Показатели частоты встречаемости вариантов течения фиброза печени у больных коинфекцией ВИЧ и ВГС, получавших разные схемы АРТ (схема № 1 - внутренний круг, схема № 2 - наружный круг), при разном порядке инфицирования

Данный фрагмент исследования показал, что схема проведения АРТ оказывает влияние на характер течения фиброза печени в соответствии с порядком поступления вирусных возбудителей в организм. В случаях, когда первым в организм поступает ВИЧ (35 больных), частота встречаемости прогрессирующего течения фиброза печени не проявляет достоверных различий

при использовании обеих схем антиретровирусной терапии. В группе, в которой первым в организме оказывался ВГС (37 больных), при лечении ингибиторами обратной транскриптазы в сочетании с ингибиторами протеазы или интегразы прогрессирующее течение фиброза печени не регистрировалось вообще, а частота регрессирующего течения фиброза печени достигала 57%, в то время как при лечении только ингибиторами обратной транскриптазы частота встречаемости прогрессирующего течения приближалась к половине случаев (43%) при достоверном 4-кратном сокращении числа лиц с регрессией фиброзных изменений в печени.

Учитывая тот факт, что основной причиной летального исхода при коинфекции ВИЧ/ВГС являются декомпенсированные заболевания печени, основные усилия исследователей сосредоточены на поиске средств эффективного лечения хронического гепатита С и их сочетания с антиретровирусной терапией [2,10,13]. Гораздо меньше внимания уделяется влиянию самой АРТ на развитие фиброзных изменений в печени, приводящих к прогрессирующему поражению печени у коинфицированных пациентов, а существующие данные весьма противоречивы. С одной стороны, указывается, что АРТ ассоциирована с замедлением фиброзных изменений в печени [16,17], с другой стороны, у коинфицированных ВИЧ/ВГС больных наблюдается нарушение иммунологического ответа в условиях АРТ, и возрастает риск связанной с АРТ гепатотоксичности [3]. В литературе нами не обнаружено обсуждения такого аспекта применения АРТ как его взаимосвязь с порядком коинфицирования вирусами иммунодефицита человека и гепатита С.

Полученные нами данные позволяют констатировать, что при оценке факторов риска прогрессирующего течения фиброза печени у больных, коинфицированных ВИЧ и ВГС, следует учитывать проведение больному антиретровирусной терапии, сочетание препаратов для АРТ, а также, при возможности, порядок поступления вирусных возбудителей в организм пациента. Установлено, что сам факт приема АРТ значительно увеличивает возможность регрессирующего течения фиброзных изменений печени, при этом наиболее благоприятной для развития фиброзного процесса в печени служила схема лечения, при которой ингибиторы обратной транскриптазы находились в сочетании с ингибиторами протеазы или интегразы. В последнем случае, если инфицирование ВГС происходило раньше, чем ВИЧ, прогрессирующего течения фиброза печени не отмечалось вообще.

ЛИТЕРАТУРА

1. Балмасова И.П., Аристанбекова М.С., Малова Е.С., Сепиашвили Р.И.. Механизмы взаимодействия вирусных возбудителей у больных, коинфицированных виру-

сами иммунодефицита человека и гепатита С. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии 2016; 5; 101-109.

2. Кравченко А.В., Аксенова В.Я., Гуркина Л.А. и др. Ингибитор интегразы ВИЧ ралтегравир в составе схем антиретровирусной терапии у больных ВИЧ-инфекцией и гепатитом С. Инфекционные болезни 2015; 3; 5-11.

3. Кравченко А.В., Максимов С.Л. Вопросы антиретровирусной терапии и терапии хронического гепатита С у больных с ВИЧ-инфекцией. Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение 2014; 1; 70-76.

4. Anderson J.P., Tchetgen E.J., Lo Re V. et al. Antiretroviral therapy reduces the rate of hepatic decompensation among HIV- and hepatitis C virus-coinfected veterans. Clin Infect Dis 2014; 58 (5); 719-727.

5. Balmasova I, Aristanbekova M., Malova E., Sepiashvili R. A new methodological approach to the evaluation of the course and conduct of therapy patients co-infected with human immunodeficiency virus and hepatitis C virus. In: Allergy, Asthma & Immunophysiology: Innovative technologies. Ed. Prof. Revaz Sepiashvili. Filidiritto International Proceedings 2016; 243-250.

6. Brau N., Salvatore M., Rios-Bedoya C.F. et al. Slower fibrosis progression in HIV/HCV coinfecting patients with successful HIV suppression using antiretroviral therapy. J Hepatol 2006; 44 (1); 47-65.

7. Chen J.Y., Feeney E.R., Chung R.T. HCV and HIV coinfection: mechanisms and management. Nat Rev Gastroenterol Hepatol 2014; 11 (6); 362-371.

8. Coppola N., Martini S., Pisaturo M. et al. Treatment of chronic hepatitis C in patients with HIV/HCV coinfection. World J Virol 2015; 4 (1); 1-12.

9. EACS European AIDS Clinical Society [Text] / EACS Guidelines Version 7.0 2. 2014; <http://www.eacsociety.org/guidelines/eacs-guidelines/eacs-guidelines.html>.

10. Esposito I., Labarga P., Barreiro P. et al. Dual antiviral therapy for HIV and hepatitis C - drug interactions and side effects. Expert Opin Drug Saf 2015; 14 (9); 1421-1434.

11. Graham C.S., Baden L.R., Yu E. et al. Influence of human immunodeficiency virus infection on the course of hepatitis C virus infection: a meta-analysis. Clin Infect Dis 2001; 33 (4); 562-569.

12. Iannello A., Debbecche O., Samarani S., Ahmad A. Antiviral NK cell responses in HIV infection: II. viral strategies for evasion and lessons for immunotherapy and vaccination. J Leukoc Biol 2008; 84 (1); 27-49.

13. Kaur K., Gandhi M.A., Slish J. Drug-drug interactions among hepatitis C virus (HCV) and human immunodeficiency virus (HIV) medications. Infect Dis Ther 2015; 4 (2); 159-172.

14. Khakoo S.I., Thio C.L., Martin M.P. et al. HLA and NK cell inhibitory receptor genes in resolving hepatitis C virus infection. Science 2004; 305 (5685); 872-874.

15. Limketkai B.N., Mehta S.H., Sutcliffe C.G. et al. Relationship of liver disease stage and antiviral therapy with liver-related events and death in adults coinfecting with HIV/HCV. JAMA 2012; 308 (4); 370-378.

16. Loko M.A., Bani-Sadr F., Valantin M.A. et al. Antiretroviral therapy and sustained virological response to HCV therapy are associated with slower liver fibrosis progression in HIV-HCV-coinfecting patients: study from the ANRS CO 13 HEPAVIH cohort. Antivir Ther 2012; 17 (7); 1335-1343.

17. Macías J., Vilorio M.M., Rivero A. et al. Lack of short-term increase in serum mediators of fibrogenesis and in non-invasive markers of liver fibrosis in HIV/hepatitis C virus-coinfecting patients starting maraviroc-based antiretroviral therapy. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2012; 31 (8); 2083-2088.

18. Rotman Y., Liang T.J. Coinfection with hepatitis C virus and human immunodeficiency virus: virological, immunological, and clinical outcomes. J Virol 2009; 83 (15); 7366-7374.

19. Sherman K.E., Thomas D.L., Chung R.T. Human immunodeficiency virus and liver disease forum 2010: conference proceedings. Hepatology 2011; 54 (6); 2245-2253.

20. Smit C., van den Berg C., Geskus R. et al. Risk of hepatitis-related mortality increased among hepatitis C virus/HIV-coinfecting drug users compared with drug users infected only with hepatitis C virus: a 20-year prospective study. J Acquir Immune Defic Syndr 2008; 47 (2); 221-225.

21. Smith C., Sabin C.A., Lundgren J.D. et al. Factors associated with specific causes of death amongst HIV-positive individuals in the D: A: D Study. AIDS 2010; 24 (10); 1537-1548.

22. Thein H.H., Yi Q., Dore G.J., Krahn M.D. Natural history of hepatitis C virus infection in HIV-infected individuals and the impact of HIV in the era of highly active antiretroviral therapy: a meta-analysis. AIDS 2008; 22 (5); 1979-1991.

23. Thompson M.A., Aberg J.A., Cahn P. et al. Antiretroviral treatment of adult HIV infection 2010 recommendations of the international AIDS society-USA panel. JAMA 2010; 304 (3); 321-333.

24. Weber R., Sabin C.A., Friis-Møller N. et al. Liver-related deaths in persons infected with the human immunodeficiency virus: the D: A: D study. Arch Intern Med 2006; 166 (15); 1632-1641.

25. Wilkins E., Nelson M., Agarwal K. et al. British HIV Association guidelines for the management of hepatitis viruses in adults infected with HIV 2013. HIV Med 2013; 14 (4); 1-71.

SUMMARY

ANTIRETROVIRAL THERAPY AND THE RISK OF LIVER FIBROSIS PROGRESSION IN HIV/HCV COINFECTED PATIENTS

Arystanbekova M., Balmasova I., Malova E., Sepiashvili R.

Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russia

The purpose of the study is to determine the nature of the impact of antiretroviral therapy on the development of

liver fibrosis in patients coinfecting with human immunodeficiency virus (HIV) and hepatitis C virus (HCV), depending on the order of pathogens acquisition. The fact is that the HIV/HCV coinfection is one of the most common pathological conditions worldwide and liver disease is a major cause of death for these patients. We have previously described the phenomenon, according to which the order of viral pathogens acquisition in HIV/HCV coinfecting patients has a significant impact on the degree of progression of liver fibrosis. Introduction to clinical practice of antiretroviral therapy greatly increased the life expectancy of HIV-infected patients, however, the impact of ART on a progressive course of liver fibrosis in HIV/HCV coinfecting patients have not yet been definitively established.

Key words: human immunodeficiency virus (HIV), hepatitis C virus (HCV), co-infection, antiretroviral therapy (ART), liver fibrosis.

РЕЗЮМЕ

АНТИРЕТРОВИРУСНАЯ ТЕРАПИЯ И РИСК ПРОГРЕССИРОВАНИЯ ФИБРОЗА ПЕЧЕНИ У БОЛЬНЫХ, КОИНФИЦИРОВАННЫХ ВИЧ/ВГС

Аристанбекова М.С., Балмасова И.П., Малова Е.С., Сепиашвили Р.И.

Российский университет дружбы народов, Москва, Российская Федерация

Целью исследования явилось определение характера влияния противовирусной терапии на развитие фиброза печени у больных, коинфицированных вирусами иммунодефицита человека (ВИЧ) и гепатита С (ВГС), в зависимости от порядка поступления патогенов в организм пациента. Коинфекция ВИЧ/ВГС - одна из часто встречающихся патологий; причиной ее летального исхода в настоящее время служит поражение печени. Ранее авторами был описан феномен, согласно

которому порядок поступления вирусных возбудителей в организм коинфицированного ВИЧ/ВГС пациента значительно влияет на степень прогрессирования фиброза печени. Введение в клиническую практику антиретровирусной терапии значительно увеличило продолжительность жизни ВИЧ-инфицированных пациентов, однако ее влияние на прогрессирование фиброза печени у больных коинфекцией ВИЧ/ВГС по сей день окончательно не установлено.

რეზიუმე

ანტირეტროვირუსული თერაპია და ღვიძლის ფიბროზის პროგრესირების რისკი აივ- და C ჰეპატიტის ვირუსით დაავადებულებში

მ. არისტანბეკოვა, ი. ბალმასოვა, ე. მალოვა,
რ. სეფიაშვილი

რუსეთის ხალხთა მეგობრობის უნივერსიტეტი, მოსკოვი, რუსეთის ფედერაცია

კვლევის მიზანს წარმოადგენდა ანტივირუსული თერაპიის გავლენის შეფასება ღვიძლის ფიბროზის განვითარებაზე ადამიანის იმუნოდეფიციტის ვირუსით (აივ) და C ჰეპატიტის ვირუსით (HCV) კოინფიცირებული პაციენტების ორგანიზმში.

ადრე ავტორების მიერ აღწერილია შემთხვევა, სადაც დადასტურებულია, რომ აივ/HCV კოინფიცირებული პაციენტების ორგანიზმში ვირუსული პათოგენების შეყვანა მნიშვნელოვნად მოქმედებს ღვიძლის ფიბროზის პროგრესირებაზე. კლინიკურ პრაქტიკაში ანტირეტროვირუსული თერაპიის დანერგვამ საგრძნობლად გაზარდა აივ-ინფიცირებულ პაციენტთა სიცოცხლის ხანგრძლივობა, თუმცა, ანტირეტროვირუსული თერაპიის გავლენა ღვიძლის ფიბროზის პროგრესირებაზე აივ/HCV კოინფიცირებულ პაციენტებში დღემდე საბოლოოდ დადგენილი არ არის.

КОМБИНИРОВАННАЯ ИММУНОТЕРАПИЯ РЕЦИДИВИРУЮЩЕГО ХРОНИЧЕСКОГО НЕСПЕЦИФИЧЕСКОГО ВУЛЬВОВАГИНИТА У ИММУНОКОМПРОМЕТИРОВАННЫХ ДЕВОЧЕК

²Нестерова И.В., ¹Ковалева С.В., ¹Чудилова Г.А., ¹Ломтатидзе Л.В., ³Крутова В.А.,
³Асланян И.Э., ³Тулендинова А.И., ⁴Малиновская В.В.

¹Кубанский государственный медицинский университет, Краснодар; ²Российский университет дружбы народов, Москва; ³Базовая акушерско-гинекологическая клиника Кубанского государственного медицинского университета, Краснодар; ⁴ФГБУ «НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия

Клиническое значение острых и хронических воспалительных поражений генитального тракта в детском возрасте определяется, прежде всего, тем, что они могут быть причиной серьезных нарушений основных функций женского организма, в том числе репродуктивной системы. Решение проблем охраны репродуктивного здоровья детей и подростков, профилактики и лечения гинекологических заболеваний в детском возрасте является актуальной проблемой и по сей день привлекает внимание ученых-гинекологов. Первое место в структуре гинекологических заболеваний девочек младшего школьного и дошкольного возраста занимают вульвовагиниты, максимальная доля которых приходится на возраст 2-7 лет. В этот период иммунные механизмы защиты находятся в стадии функционального становления и под влиянием частых ОРВИ, дисбиотических нарушений слизистых, наличия функциональных нарушений органов и систем, хронической соматической и эндокринной патологии могут возникнуть срывы в работе иммунной системы (ИС) с дебютом иммунной недостаточности – иммунокомпromетированные дети [4,6,8]. Одним из клинических проявлений у иммунокомпromетированных детей данного возраста является хронический неспецифический вульвовагинит (ХНВВ). Любое снижение реактивности детского организма, которое чаще всего возникает у девочек с хроническим воспалительным процессом генитального тракта или после какого-либо острого заболевания различной локализации, приводит к нарушению микрофлоры влагалища. Более 60% вульвовагинитов у девочек дошкольного и младшего школьного возраста имеют рецидивирующий характер и возникают на фоне обострения экстрагенитальной патологии. Заслуживает внимание порой непрерывное течение воспалительного процесса с короткими периодами ремиссии, резистентности либо непродолжительное и минимальное улучшение на фоне традиционной терапии. Сложность интерпретации данных при обследовании девочек приводит к недооценке риска влияния различных факторов на здоровье растущего организма. ХНВВ способствуют формированию синехий, образованию рубцовых изменений во влагалище, манифестации или прогрессированию аллергопатологии и, как следствие, нарушению репродуктивных функций [1,8]. Развитие рецидива вульвовагинита, как правило, связывают с неадекватно

проведенной терапией как ХНВ, так и экстрагенитальной патологии. Поиски новых методов лечения идут по пути заимствования опыта «взрослых» гинекологов. Однако имеющийся стандарт лечебных воздействий, преимущественно влияет на основные симптомы и в меньшей степени на этиопатогенетические причины рецидивирующего ХНВВ, при этом совершенно не учитываются его иммунопатогенетические особенности. Такая терапия для девочек малоприменима [1,5-7]. В этой связи представляет интерес уточнение иммунопатогенеза ХНВВ у девочек и разработка рациональных методов иммунотерапии.

Цель - разработать эффективную программу комбинированной иммунотерапии для лечения иммунокомпromетированных девочек, страдающих рецидивирующим хроническим неспецифическим вульвовагинитом с учетом уточненных нарушений функционирования иммунной системы и системы интерферонов.

Материал и методы. Под наблюдением находилось 25 девочек в возрасте от 3 до 4 лет, страдающих рецидивирующим ХНВВ в стадии обострения. Контрольную группу составили 12 условно здоровых девочек соответствующего возраста. Проведено клиническое, лабораторное и иммунодиагностическое исследование. Для оценки состояния иммунной системы использовалось иммунофенотипирование Т-, В-лимфоцитов, естественных киллерных клеток (ЕКК). Исследование фагоцитарной и микробицидной функции нейтрофильных гранулоцитов (НГ) проводили с определением количества активно фагоцитирующих НГ (%ФАН, ФЧ, ФИ), оценкой переваривающей активности (%П, ИП). NADPH-оксидазную активность НГ определяли по показателям NBT-теста спонтанного и стимулированного (*St. aureus*), при этом учитывался % формазан-положительных НГ (%ФПК), средний цитохимический индекс (СЦИ), по соотношению %ФПКст/%ФПКсп рассчитывался коэффициент мобилизации (КМ). Применяя методы иммуноферментного анализа, тестировались уровни сывороточных IgA, IgM, IgG, IgE, ИФН α , ИФН γ (тест-системы ООО «Вектор-Бест», Новосибирск).

Статистическую обработку данных проводили в StatSoft Statistica v.6.0.

Результаты и их обсуждение. Из 25 обследованных девочек, страдающих рецидивирующим ХНБВ в стадии обострения, выявлено 14 девочек, имеющих критериальные клинические признаки иммунодефицита: возвратные ОРВИ с частотой более 10 раз в год, частые обострения ХНБВ. Анализ состояния ИС и системы интерферонов у этих пациенток позволил выявить определенные нарушения их функционирования. Так, выявлено достоверное снижение абсолютного содержания $CD3^+CD8^+$ -лимфоцитов ($0,9 [0,83; 1,02] \times 10^9/\text{л}$ против $1,38 [0,91; 1,63] \times 10^9/\text{л}$ в контроле, $p < 0,05$), $CD3^+CD16^+CD56^+$ -лимфоцитов ($0,33 [0,24; 0,37] \times 10^9/\text{л}$ против $0,43 [0,31; 0,48] \times 10^9/\text{л}$ в контроле, $p < 0,05$) у девочек с ХНВ в сравнении с контролем (рис. 1). На фоне достоверного уменьшения абсолютных значений $CD3^+CD19^+$ -лимфоцитов ($0,62 [0,52; 0,71] \times 10^9/\text{л}$ против $1,01 [0,95; 1,24] \times 10^9/\text{л}$ в контроле, $p < 0,05$) установлено значительное снижение в 2 раза уровня сывороточных IgA ($p < 0,05$) и IgG ($p < 0,05$) и уменьшение в 1,5 раза концентрации IgM ($p < 0,05$) (рис. 1,2).

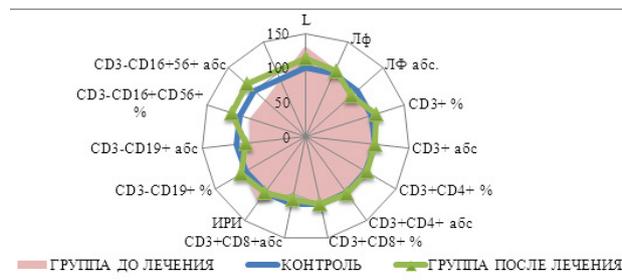


Рис. 1. Состояние клеточного иммунитета у иммунокомпрометированных девочек с рецидивирующим ХНВ на фоне комбинированной иммунотерапии (процент от контроля)

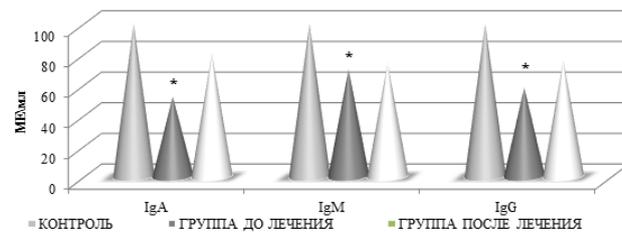


Рис. 2. Состояние гуморального иммунитета (сывороточные IgA, IgM, IgG) у иммунокомпрометированных девочек с рецидивирующим ХНВ на фоне комбинированной иммунотерапии

Снижение основных классов иммуноглобулинов, очевидно, связано с переключением В лимфоцитов на синтез IgE, что сопровождается проявлениями атопического дерматита, атопического вульвовагинита. Уменьшение уровня IgA способствует увеличению проницаемости слизистых оболочек для аллергенов, что ведет к антигенемии, повышению титра реагиновых антител (IgE, IgG₄).

В результате анализа уровней сывороточного IgE у девочек, страдающих атопическим дерматитом, сформированы 2 подгруппы: I подгруппа (64% случаев) уровни сывороточного IgE достоверно не отличались от контрольных параметров ($p > 0,05$); II подгруппа (36% случаев) характеризовалась высокими уровнями IgE, которые значительно превышали контрольные значения: $112,51 (96,4; 172,2)$ МЕ/мл против $26,83 (10,4; 38,3)$ МЕ/мл ($p < 0,05$) (рис. 3). При этом следует отметить, что в группе исследования 64% девочек с ХНБВ страдали атопическим дерматитом.

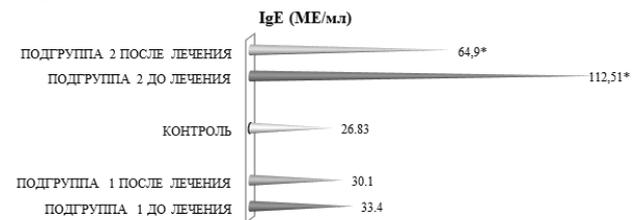


Рис. 3. Динамика уровня общего IgE у иммунокомпрометированных девочек с ХНБВ на фоне комбинированной иммунотерапии

Предполагаем, что дефицит сывороточных IgA, IgG, IgM способствует поддержанию воспалительного процесса и создает предпосылки для частого обострения ХНБВ с короткими межрецидивными периодами, яркими или стертыми клиническими проявлениями. При этом реализуются IgE-зависимые или IgE-независимые механизмы формирования атопии ввиду чрезмерной нагрузки инфекционными и неинфекционными антигенами.

При исследовании фагоцитарной функции НГ у девочек с ХНБВ отмечалось снижение в 1,4 раза %ФАН ($44,86 [39; 51]\%$ против $61,08 [53,8; 68,8]\%$ в контроле, $p < 0,05$). Показатели поглощающей способности НГ имели тенденцию к снижению: ФЧ и ФИ ($p > 0,05$). При этом процессы переваривания и завершенности фагоцитоза (%П и ИП) не отличались от контроля ($p > 0,05$). Активность NADPH-оксидаз, оцениваемая в спонтанном NBT-тесте, значительно повышается (в 3,9 раз) – адекватное реагирование НГ в ответ на развитие воспалительного процесса. Дополнительная антигенная нагрузка выявила истощение резервных возможностей кислородзависимых механизмов НГ у исследуемой группы, проявляющееся отсутствием ответа NADPH-оксидаз на *St. aureus* (КМ $1,31 [0,83; 1,5]$ против $2,46 [1,65; 2,38]$ в контроле, $p < 0,05$) (рис. 4). Дефектное функционирование первой аварийной линии защиты – системы НГ, не способствует своевременному купированию воспалительного процесса и может приводить к частому рецидивированию ХНБВ, что следует учитывать при определении тактики диагностики и лечения девочек с данной патологией.

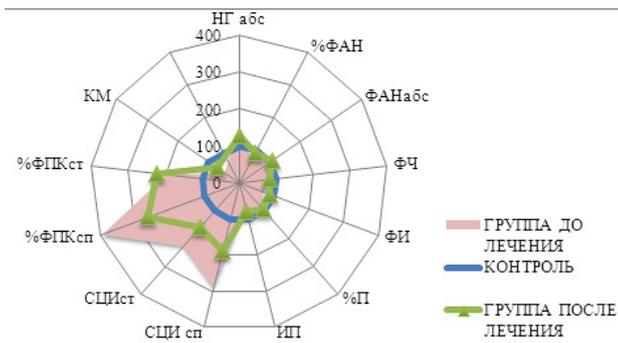


Рис. 4. Фагоцитарная и микробицидная функции нейтрофильных гранулоцитов у иммунокомпрометированных девочек с ХНВВ на фоне комбинированной иммунотерапии (процент от контроля)

При оценке интерферонового статуса у исследуемой группы девочек установлено, что уровень ИФНа был снижен (в 1,8 раза) 5,75 (2,23; 13,56) пг/мл против 10,56 (4,46; 15,35) пг/мл в контроле ($p > 0,05$), в то время как уровень ИФНу составил 3,37 (0; 11,37) пг/мл, что в 2,98 раза выше показателей группы контроля - 1,13 (0; 5,71) пг/мл ($p > 0,05$). Эти данные свидетельствуют о неадекватном ответе системы ИФН у иммунокомпрометированных девочек, страдающих возвратными ОРВИ - отсутствие адекватного повышения уровней сывороточных ИФНа, ИФНу на фоне возвратных ОРВИ с частотой более 10 раз в год.

Таким образом, у иммунокомпрометированных девочек, страдающих ХНВВ, установлены: дефицит цитотоксических Т лимфоцитов, ЕКК, сывороточных ИФНа, ИФНу, IgA, IgM, IgG и дефекты фагоцитарной активности НГ. Необходимо подчеркнуть, что перечисленные нарушения функционирования ИС выявлены в период обострения ХНВВ, но при этом отсутствовали клинические проявления ОРВИ. Эти данные свидетельствуют об отсутствии развития адекватного иммунного ответа на имеющийся неспецифический воспалительный процесс. При этом дефектное функционирование ИС является причиной частых рецидивов ХНВВ и возвратных ОРВИ.

Принимая во внимание выявленные дефекты функционирования ИС и нарушения интерферонового статуса у иммунокомпрометированных девочек, нами разработана программа комбинированной иммунотерапии продолжительностью 2,5 месяца с использованием локальной и системной терапии рекомбинантным человеческим интерфероном 2b в комбинации с антиоксидантами (виферон) в сочетании с глюкозаминилмурамилдипептидом - ликолипид (таблица), органично включающаяся в комплекс терапевтических мероприятий. Ранее комбинированная интерфероно- и иммунотерапия успешно зарекомендовала себя в иммунореабилитации иммунокомпрометированных детей с возвратными ОРВИ [2-4].

Анализ клинической эффективности при наблюдении в катамнезе спустя год продемонстрировал, что после проведенной комбинированной иммунотерапии сократилась частота обострений ХНВВ в 3,4 раза с 6,2 до 1,8 раз в год ($p < 0,05$) и при этом длительность обострений уменьшилась с 12-14 дней до 7-8 дней. Клиническая картина возникающих обострений ХНВВ после комплекса лечебных мероприятий характеризовалась более сглаженной симптоматикой. Так, до проведения комплексного лечения с включением комбинированной иммунотерапии, период обострения характеризовался выраженным дискомфортом в области вульвы и влагалища, гиперемией и отеком вульвы, выделениями из половых путей (бели), а после лечения - умеренным дискомфортом и гиперемией в области вульвы и влагалища. Кроме того, уменьшилась частота ОРВИ с 14,8 до 5,2 эпизодов в год, $p < 0,05$ и сократилась их длительность с 10-14 дней и до 5 дней, что снизило необходимость антибактериальной терапии вследствие отсутствия осложненного течения ОРВИ. Клинически благополучный период значительно увеличился с 6 до 11 месяцев в году между повторными ОРВИ, и с 9 до 11,5 месяцев в году между обострениями ХНВВ. В результате проведенного лечения получен позитивный клинический эффект, заключающийся

Таблица. Программа комбинированной иммунотерапии у иммунокомпрометированных девочек с рецидивирующим ХНВ

Цель применения препарата	Схема терапии
Коррекция и модуляция ИФН статуса	Базисная системная терапия рекомбинантным человеческим ИФН α 2b в комбинации с антиоксидантами (виферон): виферон 150 тыс. МЕ 1 свеча 1 раз в день утром и 500 тыс МЕ 1 свеча 1 раз в день на ночь – 20 дней, далее виферон 500 тыс ЕД 1 свеча 1 раз в день – 20 дней, далее 150 тыс. МЕ 1 свеча 2 раза в день – 20 дней, далее 150 тыс. МЕ 1 свеча 1 раз в день – 20 дней. Локальная терапия виферон гелем – смазывание 3-4 раза в день носовых ходов, ротоглотки, вульвы в течение 2,5 мес.
Направленная коррекция нарушений НГ	Глюкозаминоилмурамилдипептид (ликолипид) 1 мг/сутки два 10-дневных прерывистых курса с интервалом в 2 недели.

как в уменьшении остроты, продолжительности обострения ХНВВ, в среднем, на 4-7 дней, так и в сокращении частоты обострений ХНВВ на фоне значительного уменьшения заболеваемости возвратными ОРВИ. Немаловажно отметить, что на фоне проведения комбинированной иммунотерапии отмечалась хорошая переносимость лечения и побочных эффектов не зарегистрировано.

Позитивные клинические эффекты комбинированной иммунотерапии сопровождались положительной динамикой изменений в ИС. Достигнута нормализация ранее сниженного количества лимфоцитов с цитотоксической функцией ($CD3^+CD8^+$; $CD3^+CD16^+CD56^+$), что приводит к восстановлению эффекторной функции противоинфекционного иммунитета (рис. 1). Отмечается восстановление абсолютных значений $CD3^+CD19^+$ и на этом фоне уровень сывороточных IgA, IgG, ранее сниженный в 2 раза, достоверно повышается до контрольных значений (рис. 1, 2). Кроме того, выявлено снижение IgE в 1,8-2,2 раза у 36% детей с ранее повышенным уровнем IgE (II подгруппа) и неизменный по отношению к контролю уровень IgE у 64% детей (I подгруппа) (рис. 3). Анализ фагоцитарной и микробицидной функции НГ показал восстановление активно фагоцитирующих НГ (%ФАН); показателей поглощающей способности НГ (ФЧ и ФИ) (рис. 4). Произошла реставрация резервных возможностей НГ, проявляющаяся в повышении КМ на фоне сохраняющейся умеренно повышенной активности NADPH-оксидаз в спонтанном и стимулированном NBT-тесте (рис. 4). Данные изменения, безусловно, позитивные, но демонстрируют сохраняющуюся напряженность микробицидных систем НГ в связи с продолжающейся антигенной нагрузкой (инфекционные антигены, аллергены), что требует внимания и продолжения проведения реабилитационных мероприятий, способствующих полной коррекции дисфункции НГ.

В результате проведения комбинированной иммунотерапии выявлена тенденция к повышению уровня ИФНа до 8,45 (4,93; 10,92) пг/мл по сравнению с 10,56 (4,46; 15,35) пг/мл в контроле, при этом уровень ИФН γ не менялся 3,81 (0,07; 7,54). Следует отметить, что этот эффект получен при отсутствии обострения ХНВ и вне острого периода ОРВИ. Данные изменения интерферонового статуса могут быть расценены как позитивные, так как выявленная до лечения недостаточная продукция ИФНа, ИФН γ на фоне острого и рецидивирующего воспалительного процесса была компенсирована после лечения восстановлением как клеток продуцентов ИФН, так и уровня интерферонов, что клинически сопровождается уменьшением частоты и выраженности воспаления генитального и респираторного трактов.

Выводы:

1. Установлены иммунопатогенетические особенности, обуславливающие возникновение и формирование ХНВВ, ассоциированные с возвратными ОРВИ и атопией у иммунокомпрометированных девочек, что обуславливает резистентность к проводимой традиционной терапии.
2. Разработана программа комбинированной иммунотерапии, с учетом выявленных нарушений противовирусного иммунитета, дефектного функционирования НГ, дефицита сывороточных IgA, IgM, IgG, дефектного функционирования системы ИФН, для иммунокомпрометированных девочек, страдающих рецидивирующими ХНВВ и возвратными ОРВИ.
3. Разработанная программа комбинированной иммунотерапии с включением виферона и ликопида позволила получить позитивный клинико-иммунологический и протективный эффект (наблюдение в анамнезе 1 год) у иммунокомпрометированных девочек с рецидивирующим ХНВВ и возвратными ОРВИ.
4. Программа комбинированной иммунотерапии продемонстрировала безопасность использования в 100% случаев.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гуркин Ю.А. Опыт поэтапного лечения неспецифических вульвовагинитов у девочек. Репродуктивное здоровье детей и подростков 2009; 5; 15-20.
2. Нестерова И.В. Интерфероны в практике клинициста: лучшие друзья или опасные враги? Аллергология и иммунология 2016; 17 (3); 189-191.
3. Нестерова И.В., Ковалева С.В., Чудилова Г.А., Ломтадзе Л.В. и др. Оптимизация тактики интерферон- и иммунотерапии в реабилитации иммунокомпрометированных детей с повторными респираторными и герпетическими вирусными инфекциями. Педиатрия 2014; 93(3); 66-72.
4. Нестерова И.В., Малиновская В.В., Тараканов В.А., Ковалева С.В. Интерферон- и иммунотерапия в практике лечения часто и длительно болеющих детей и взрослых. Capricorn Publishing Inc. USA, UK, Russia. 2004; 158.
5. Нестерова И.В., Сепиашвили Р.И. Иммунологические препараты и современная иммунотерапия в клинической иммунологии и медицине. Аллергология и иммунология 2000; 3; 18-28.
6. Сепиашвили Р.И. Физиология иммунной системы. М.: Медицина -Здоровье, 2015; 328.
7. Сепиашвили Р.И. Основные принципы применения иммуномодулирующих препаратов в клинической практике. Аллергология и иммунология 2015; 15(1); 70-74.
8. Уварова Е.В., Батырова З.К. Физиология и патология наружных половых органов у девочек в периоде детства. Репродуктивное здоровье детей и подростков 2012; 4; 35-50.

SUMMARY

COMBINED IMMUNOTHERAPY OF RECONDITIONAL CHRONIC NON-SPECIFIC VULVOVAGINITIS IN IMMUNOCOMPROMISED GIRLS

²Nesterova I., ¹Kovaleva S., ¹Chudilova G.,
¹Lomtadidze L., ³Krutova V., ³Aslanian I.,
³Tulendinova A., ⁴Malinovskaya V.

¹Kuban state medical University, Krasnodar; ²The Peoples' Friendship University of Russia, Moscow; ³Obstetric-Gynecologic Clinic of Kuban state medical University, Krasnodar; ⁴Federal State Research Center of Epidemiology and microbiology named after N.F. Gamaleya, Russia

Nonspecific chronic vulvovaginitis (CNV) is often a clinical indicator of immune deficiency, especially in young girls. The established violations of the functioning of various parts of the immune system (IS) in this pathology dictate the need to include in the complex of immunomodulatory therapy. The developed program of combined immunotherapy for immunocompromised girls allows to reduce the severity and duration of exacerbation of CNV, their frequency against the background of a significant reduction in the incidence of ARVI. Positive clinical effects were observed against the background of the restoration of the functioning of the IS. A protective effect was obtained (observation in a catamnesis for 1 year) - the duration of a clinically safe period increased from 6 to 11-11,5 months per year.

Keywords: immunocompromised girls, immunotherapy, vulvovaginitis.

РЕЗЮМЕ

КОМБИНИРОВАННАЯ ИММУНОТЕРАПИЯ РЕЦИДИВИРУЮЩЕГО ХРОНИЧЕСКОГО НЕСПЕЦИФИЧЕСКОГО ВУЛЬВОВАГИНИТА У ИММУНОКОМПРОМЕТИРОВАННЫХ ДЕВОЧЕК

²Нестерова И.В., ¹Ковалева С.В., ¹Чудилова Г.А.,
¹Ломтатидзе Л.В., ³Крутова В.А., ³Асланян И.Э.,
³Туленинова А.И., ⁴Малиновская В.В.

¹Кубанский государственный медицинский университет, Краснодар; ²Российский университет дружбы народов, Москва; ³Базовая акушерско-гинекологическая клиника Кубанского государственного медицинского университета, Краснодар; ⁴ФГБУ «НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия

Неспецифические хронические вульвовагиниты (ХНВ) часто являются клиническим индикатором иммунной недостаточности, особенно у девочек раннего возраста. Установленные нарушения функционирования раз-

личных звеньев иммунной системы (ИС) при данной патологии диктуют необходимость включения в комплекс мероприятий иммуномодулирующей терапии. Разработанная программа комбинированной иммунотерапии для иммунокомпрометированных девочек позволяет уменьшить выраженность и длительность обострения ХНВ, их частоту на фоне значительного сокращения заболеваемости ОРВИ. Позитивные клинические эффекты наблюдались на фоне восстановления функционирования ИС. Получен протективный эффект (наблюдение в катмнезе 1 год) – длительность клинически благополучного периода увеличилась с 6 до 11-11,5 месяцев в год.

რეზიუმე

მორეციდივე ქრონიკული არასპეციფიკური ვულვოვაგინიტის კომბინირებული იმუნოთერაპია იმუნოკომპრომეტირებულ გოგონებში

²ი. ნესტეროვა, ¹ს. კოვალევა, ¹გ. ჩუდილოვა,
¹ლ. ლომთათიძე, ³ვ. კრუტოვა, ³ი. ასლანიანი,
³ა. ტულენდინოვა, ⁴ვ. მალინოვსკაია

¹ყუბანის სახელმწიფო სამედიცინო უნივერსიტეტი, კრასნოდარი; ²რუსეთის ხალხთა მეგობრობის უნივერსიტეტი, მოსკოვი; ³ყუბანის სახელმწიფო სამედიცინო უნივერსიტეტის საბაზო სამედიცინო-გინეკოლოგიური კლინიკა, კრასნოდარი; ⁴რუსეთის ჯანმრთელობის დაცვის ფედერალური სახელმწიფო საბიუჯეტო დაწესებულება „ნ.ფ. ჰამალეის სახ. ეპიდემიოლოგიის და მიკრობიოლოგიის კვლევითი ინსტიტუტი“ მოსკოვი, რუსეთი

ქრონიკული არასპეციფიკური ვულვოვაგინიტი (ქავ) ხშირად წარმოადგენს იმუნოდეფიციტის კლინიკურ მანვენტებს, განსაკუთრებით - ადრეული ასაკის გოგონებში. იმუნური სისტემის (ის) სხვადასხვა რგოლის დარღვევების არსებობა აღნიშნული პათოლოგიის დროს მიუთითებს იმუნომოდულაციური თერაპიის ჩართვის აუცილებლობაზე მკურნალობის კომპლექსში.

შემუშავებული კომბინირებული იმუნოთერაპიის პროგრამა უზრუნველყოფს ქრონიკული არასპეციფიკური ვულვოვაგინიტის გამწვავების სისხირის, გამოხატვის ხარისხის და ხანგრძლივობის შემცირებას მწვავე რესპირაციული ვირუსული ინფექციით ავადობის მნიშვნელოვანი დაქვეითების ფონზე. დადებითი კლინიკური შედეგები შეინიშნებოდა იმუნური სისტემის ფუნქციონირების აღდგენის ფონზე. მიღებულია დამცავი ეფექტი (კატამნეზური დაკვირვება - 1 წელი): კლინიკურად კეთილსაიმედო პერიოდი გახანგრძლივდა წელიწადში 6 თვიდან 11-11,5 თვემდე.

AUTOIMMUNE LIMBIC ENCEPHALITIS (CASE REPORTS)

¹Kobaidze K., ²Harrison A., ¹Burklin Y., ¹Patidar V., ¹Riccardi M.

¹Emory University School of Medicine, Division of Hospital Medicine; ²Division of Neurology Atlanta, USA

Anti-GAD antibody associated limbic encephalitis (LE) is a challenging diagnosis that affects the medial temporal lobes of the brain [5-7].

While many of the cases of LE associated with other antibodies are due to a paraneoplastic process, anti-GAD LE is not associated with paraneoplastic disease (non-paraneoplastic limbic encephalitis, NPLE). MRI brain is usually demonstrates T2/flair changes in the mesial temporal lobes.

Case 1. A 60-year-old male with history of HTN, ESRD on hemodialysis (HD) for ten years presented to outside hospital with altered mental state (AMS), headache, and vomiting for one day prior to arrival. His blood pressure was elevated and there was initial concern for hypertensive encephalopathy or serotonin syndrome. Cyproheptadine was administered. Head CT and MRI brain detected old lacunar infarctions, moderate white matter changes and atrophy. An electroencephalogram (EEG) showed sharp waves and levetiracetam was initiated. An analysis of CSF at previous facility was notable for a protein of 67 mg/dl, WBCs of 23 cells, RBCs 146 cells, and negative for HSV, WNV, cryptococcus antigen (Table 1). He developed fever, and empiric broad-spectrum antibiotics (vancomycin, levofloxacin, ceftriaxone, and eventually meropenem) were administered due to concern for occult infection. Erythrocyte sedimentation rate (ESR) was elevated up to 95 mm/sec, blood and CSF cultures were sterile; CXR showed right apical density that was felt to be consistent with atelectasis. Transthoracic echocardiogram showed preserved EF 55%, with moderate diastolic dysfunction; abdominal and pelvis CT showed diverticulosis without diverticulitis, bilateral renal atrophy, no evidence of gallbladder disease. His liver function test was within acceptable range. Patient

subsequently underwent a tagged WBC scan that was also unrevealing. His liver ultrasound was unremarkable. Due to progressive encephalopathy and difficult to control seizures, he was transferred to our facility's Neuro ICU, 9 days after initial presentation to OSH.

On arrival, his vital signs were within normal limits (T 36.7C, BP 150/78, HR 99, RR 20, SPO2 94% RA); however, his neurological examination was grossly abnormal. He was nonverbal with minimal withdrawal to pain and absent blink to threat. He had myoclonic movements of legs and startle myoclonus, a positive Babinski, jaw jerk and rooting reflex, and hyperreflexia (4+) throughout. He remained on vancomycin, meropenem and levetiracetam. The neurointensivists at our institution were originally concerned for CJD, HSV, Sjogren's disease associated encephalitis. The repeated LP detected 0 WBC, 41mg/dL of protein in the CSF; syphilis test (VDRL), CMV, HSV and WNV were negative (Table 1). No oligoclonal bands were seen and IgG index was negative and cytology was non-diagnostic. Continuous EEG showed a cluster of seizures and bilateral periodic discharges. Levetiracetam dose was increased and lacosamide was added. He continued to have seizures and topiramate and later clonazepam were added as well. MRI of the brain was unchanged from prior MRI performed at OSH. CT chest, abdomen and pelvis showed colitis but no evidence of malignancy. Due to persistent dysphagia the percutaneous gastrostomy (PEG) tube was placed.

Screening for heavy metals was negative (Table 2). The serology for autoimmune disease was unrevealing. Patient was started on empiric treatment with intravenous thiamine for possible Wernicke's encephalopathy also vitamin B1, as well as B12, and E levels were within normal range. Paraneoplastic panel including NMDA AB was negative.

Table 1. Cerebrospinal fluid (CSF) analysis

Lab values	Patient 1	Patient 2
Protein (mg/dL)	76	51
Glucose (mg/dL)	64	63
Cell Count (cells/ μ L)	2	12
Cryptococcal Ag	negative	negative
VDRL	non-reactive	non-reactive
West Nile Virus (WNV) panel	negative	NA
HSV PCR VZV PCR HHV6 PCR JCV PCR	All negative	All negative
Cytology	non-diagnostic	negative

However, anti-GAD AB was not included in these panels and was not checked at this point.

EEG showed bicentral periodic discharges concerning for cortical irritability despite four antiepileptic medications. Patient was also having periodic episodes of rigidity and right gaze deviation suggesting persistent seizure activity. A third LP was performed (two weeks after the second LP) showing a WBC of 2 cell/microL, protein of 76 mg/dL (up from 40), Gram stain detected no organism, fungal cultures were negative; WNV, EBV, JCV screening was negative (Table 2). At this point, the differential included Bickerstaff encephalitis, autoimmune cerebritis seen in some autoimmune diseases or CJD. CJD was a concern given the startle myoclonus, progressive encephalopathy, and periodic discharges seen on EEG. However 14-3-3 protein for was not detected. Repeated MRI of the brain (third time since disease onset) remained unchanged. Bickerstaff encephalitis was suspected and IVIG was started about two weeks after presenting to our institution. He received 5 days of IVIG without any noticeable improvement. Gq1b antibody for Bickerstaff encephalitis was negative.

Following IVIG, a spot EEG was repeated and showed left temporal slowing but no ictal activity and no cortical irritability. He was transferred out of the Neuro ICU to a medical floor service about three weeks after presentation

to our hospital, and one month after initial presentation to outside facility. At this point, elevated serum anti-GAD AB 97.9 IU/ml (normal is 0-5 IU/ml) was reported, and Anti-GAD antibody associated autoimmune limbic encephalitis (LE) was diagnosed. Treatment with IVIG was resumed but he developed a lower extremity venous thromboembolism thus IVIG was stopped. His hospitalization was further complicated with a GI bleed and pericardial effusion with tamponade. He became hemodynamically unstable requiring ICU care. Steroids were not considered given the GI bleed. Instead plasma exchange (PLEX) was initiated, once he was medically stable. Immediately after PLEX treatment, clinical improvement was noticed. He became more alert and was able to follow simple commands. Previously, he was somnolent and essentially mute. Following PLEX, he was able to communicate with short sentences, and started to recognize his family members, participate in PT and was able to take PO. He was eventually discharged to a skilled nursing facility after a two-month hospitalization.

The patient presented back to our hospital two months later after having multiple readmissions elsewhere for presumed recurrent pneumonia. He developed episodes of agitation in the nursing home and was admitted back to our service due to changes in his mental status. On arrival patient was agitated and was disorientated. His physical exam otherwise was unremarkable. A brain MRI was re-

Table 2. Laboratory data

Lab data	Patient 1	Patient 2
WBC, cells/ μ L	10.6	3.3
Hgb, mg/dL	8.0	7.7
HCT (%)	25.0	24.2
Platelets, cells/ μ L	223,000	300,000
Na, mmol/L	139	137
K, mmol/L	3.4	4.0
Creatinine, mg/dL	5.47	0.33
Albumin, g/dL	2.5	4.4
ANA reflex	negative	negative
C3 and C4 level	NA	3-83 C4 - 9 (L)
ANCA	negative	negative
HIV screen	negative	negative
Zika virus test	NA	Negative
Heavy metals screen	negative	negative
<i>Bartonella henselae</i> serology	negative	negative
Leptospirosis serology	negative	negative
Dengue fever IgG	NA	IgG elevated IgM negative
Paraneoplastic panel	negative	negative
N-methyl-D-aspartate receptor (NMDR) AB	negative	negative

peated and was unchanged from prior studies. Neurology team recommended empiric steroids and plasma exchange treatments for concern of LE relapse. However this treatment was stopped after serology test detected no elevation of anti-GAD antibody. He was seen by psychiatrist for depression, suicidal ideation and anxiety. His behavioral disturbances and cognitive impairment was thought to be secondary effects or sequelae of anti-GAD encephalitis. SSRI regimen was started.

Patient's seizures resolved following the initial treatment for LE but his mentation, while improved, has not returned to baseline four months out from the onset of symptoms. When last seen, he still required significant support with daily activities but had made progress. Patient's amnesia began to improve and he was able to recall events at our hospital. He continued with extensive physical, occupational and speech therapy throughout his hospitalization. Patient was able to ambulate with support and was discharged to a rehabilitation facility.

Case 2. A 30-year-old Hispanic, previously healthy, female presented to an outside hospital with lethargy and altered mental status, she had a brief upper respiratory symptoms without fever several weeks prior to admission. She had been taking over the counter naproxen for relief. However, on day of presentation to outside facility emergency room (ED), she woke up confused and lethargic. In the ED, she had several generalized, tonic-clonic seizure and was intubated for airway protection; she was admitted to their ICU. Her laboratory data was unremarkable (Table 1,2), the CSF analysis showed a lymphocytic pleocytosis (WBC 12 cells/microL), normal protein and glucose. Presumable herpes encephalitis diagnosis was entertained and empiric IV acyclovir was administered but treatment was stopped three days after when CSF HSV and VZV-PCR was found to be negative. MRI of the brain on the six days after admission demonstrated bilateral edema involving the mesial temporal lobes (Fig.). The patient was extubated and transferred to the floor; within a few days, she developed more seizures requiring phenytoin and levetiracetam administration. She was also febrile again and was restarted on acyclovir, vancomycin and piperacillin-tazobactam.

Patient was transferred to our hospital for further care on day nine from disease onset. Upon arrival to the neuro-ICU, her mental status was significantly impaired (nonverbal, not following commands) but the remainder of her neurological exam was intact with normal cranial nerves, strength, sensation and coordination.

She was placed on continuous EEG monitoring, and found to be in status epilepticus; several antiepileptic drugs including midazolam, fosphenytoin, and levetiracetam were required to control her seizures.

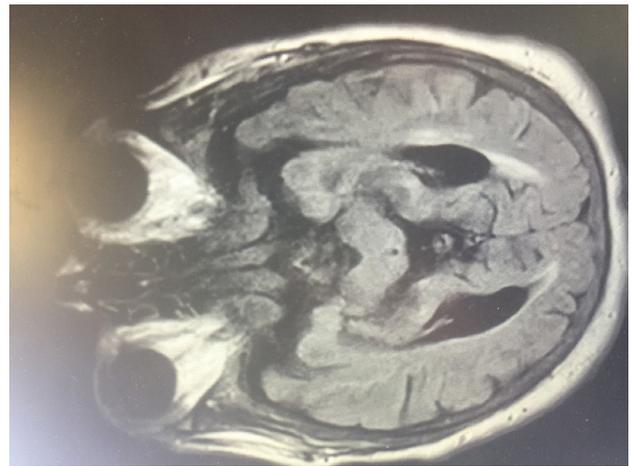


Fig. MRI image of the patient 2 demonstrates bilateral edema involving the mesial temporal lobes

Repeated LP revealed normal opening pressure, the CSF had 1 WBC cell, protein 17 mg/dL. HSV PCR was negative, cytology was unremarkable. Other serum labs for HIV, RPR, Zika virus were negative (Table 2). Further workup for infection cause detected elevated IgG to West Nile virus (WNV) with negative IgM, suggestive of previous exposure rather than active disease; the serology for *Bartonella henselae*, and leptospirosis was negative. ESR was 4, but CRP was elevated to 120 (Table 2)

Repeated MRI brain again demonstrated abnormal signal involving the mesial temporal lobes suggestive of encephalitis. NMDA encephalitis diagnosis was entertained given patient's age, clinical presentation, EEG and imaging findings as well as findings of autonomic instability.

Hence, the patient was started on empiric treatment with IVIG and completed 5 days of high dose IV methylprednisolone sodium succinate (1 gram per day). Her seizure frequency improved somewhat, but her cognitive impairment, with significant short-term memory loss and agitation, did not show as much improvement. The NMDA receptor antibody and paraneoplastic panel returned answer negative. CT of the chest, abdomen and pelvis was unremarkable, and pelvic ultrasound did not show any evidence of ovarian teratoma. She continued to have low-grade fever, and recurrent seizures requiring ICU monitoring for what lacosamide and divalproex sodium were added to the levetiracetam and fosphenytoin.

Eventually after controlling seizure activities she was transferred to the floor on hospitalist service with a neurology consultation team on board. At this point, autoimmune encephalitis work up was broadened, and anti-GAD and anti-TPO antibodies screen-detected elevated anti-GAD antibody level of 56.1 IU/ml (Table 2). Thus, her final diagnosis of LE due to Anti-GAD AB was eventually made, nearly one month after her original presentation to outside facility.

Patient was started on PLEX and received a total of 5 exchanges. At time of discharge to acute rehabilitation facility, her cognitive exam and seizure frequency had significantly improved. Besides cognitive/behavioral impairment, her neurological exam remained intact throughout her hospitalization with normal cranial nerves, strength, sensation and coordination. Repeat anti-GAD antibody level decreased to 13.6 IU following the PLEX treatment.

She spent two weeks in an acute rehab facility where she continued to make some improvement, especially with regards to seizures. However, she was still having cognitive impairment and it was recommended that she require 24-hour supervision at home. Shortly after discharge her cognitive assessment by MOCA score was 11/30, indicating continued significant cognitive impairment. Additional testing for an extensive autoimmune/encephalopathy panel (serum) including GAD 65 AB and GABA antibody was negative. Further treatment with rituximab was initiated and seizures have been controlled on levetiracetam, topiramate and lacosamide.

Discussion. Above, we have described two very different patients, both with autoimmune anti-GAD associated limbic encephalitis. The first patient was older and had prior infarctions and white matter disease making the diagnosis of limbic encephalitis more difficult. The second case was younger patient and had no significant medical history before developing onset of seizures, mental status changes and cognitive impairment. However, both of these patients went over one month before a diagnosis was made and consequently before treatment against the autoimmune process was started. Both patients had improvement in seizure frequency and duration but less improvement with the neuropsychiatric and cognitive deficits. It is unclear whether the patients' lasting cognitive deficits are due to prolonged status epilepticus or delay in initiating immunomodulating therapies (steroids, IVIG, PLEX, rituximab). Interestingly, both of our patients appeared to show more improvement with PLEX compared to IVIG. However, only IVIG has been supported in randomized, controlled trial [4]. PLEX has shown modest improvements but effect is usually short-lived.

Paraneoplastic antibodies were negative in both of our patients. However, autoimmune antibodies were not sent in timely manner. These are a separate panel that must be ordered to look for other (non-paraneoplastic) autoimmune antibodies.

Antibodies to GAD are increasingly being recognized in several neurological conditions such as Stiff-Person Syndrome, cerebellar ataxia, progressive encephalomyelitis with rigidity and myoclonus (PERM), palatal tremor as well as in limbic encephalitis. GAD AB + limbic encephalitis patients typically develop a refractory temporal lobe epilepsy [1,2]. There can be overlap of these syndromes.

Our first patient had some exam findings consistent of Stiff Person syndrome and possibly PERM, in addition to LE. However, the second patient, had features more classic for LE but possibly encephalomyelitis as well.

Glutamic acid decarboxylase (GAD) is the rate-limiting enzyme for converting glutamic acid to gamma -aminobutyric acid (GABA), a major neurotransmitter inhibitor in the CNS. A high concentration of GAD is present in the CNS at GABA-ergic nerve terminals. Thus, it is inferred that antibodies to GAD, impair GABA production. Many patients respond to treatment with immunomodulatory therapy. Symptomatic therapy with agents that increase GABA activity such as benzodiazepines and baclofen are frequently used as mainstays of treatment for Stiff Person Syndrome, but their benefits are less clear for patients with LE [3].

GAD AB elevation is not specific to neurological disease. It has been found that low-titer positivity occurs in 8% of Caucasians and in 80% of newly diagnosed type 1 diabetes [3]. However, in neurologic diseases, the titer is usually markedly elevated, thus, increasing the specificity.

Conclusion. Here we are presenting the clinical, laboratory features of two patients presenting with acute onset, medically refractory seizures, and prolonged retrograde amnesia and cognitive impairment in absence of any neoplastic process. Antibodies against onco-neural antigens, voltage-gated potassium channel and glutamate receptors, which may accompany paraneoplastic as well as non-paraneoplastic LE, were negative. Both patients' serology study detected high titers of antibodies against GAD. Both patients presented with drug resistant seizures, significant personality changes and both received IVIG followed by PLEX. Both patients showed improvement in both seizure frequency and mental status though neither patient returned to their previous baseline. Both patients had a decrease in GAD antibody levels after treatment. Both patients required prolonged hospitalization and long rehabilitation after discharge. Early diagnosis is important to initiate effective treatment with plasma exchange, or IVIG. Early rehabilitation and close outpatient monitoring by a neurologist is recommended.

REFERENCES

1. Cianci, V. Labate, A. Lanza P, et al. Non-Paraneoplastic limbic encephalitis characterized by mesio-temporal seizures and extratemporal lesions. *Seizure*, 2010; 19: 446-449.
2. Feske, S. Principles of Diagnosis: special tests, 140-58, in *Office Practice of Neurology*. Ed. by MA Samuels and S. Feske, Churchill Livingstone.
3. Dayalu, P, Teener J. Stiff Person Syndrome and other Anti-GAD-Associated Neurologic Disorders. *Semin Neurol* 2012;32, 542-549.

4. Dalakas MC. The role of IVIG in the treatment of patients with stiff person syndrome and other neurological diseases associated with anti-GAD antibodies. *J Neurol* 2005; 252: 119-125.
5. Saiz A, Blanco Y, Sabater L, et al. Spectrum of neurological syndromes associated with glutamic acid decarboxylase antibodies: diagnostic clues for this association. *Brain* 2008; 131: 2553-2563.
6. Mata S, Muscas GC, Naldi I, et al. Non-paraneoplastic limbic encephalitis associated with anti-glutamic acid decarboxylase antibodies. *J Neuroimmunol* 2008; 199: 155-159.
7. Malter MP, Helmstaedter C, Urbach H, Vincent A, Bien CG. Antibodies to glutamic acid decarboxylase define a form of limbic encephalitis. *Ann Neurol* 2010; 67: 470-478.

SUMMARY

AUTOIMMUNE LIMBIC ENCEPHALITIS (CASE REPORTS)

¹Kobaidze K., ²Harrison A., ¹Burklin Y., ¹Patidar V., ¹Riccardi M.

¹Emory University School of Medicine, Division of Hospital Medicine; ²Division of Neurology Atlanta, USA

Limbic encephalitis (LE) is an autoimmune or paraneoplastic disease that affects the medial temporal lobes. The patient will usually present with cognitive impairment, psychiatric changes, and seizures. Autoimmune limbic encephalitis (LE) is a challenging diagnosis as it is not always included in the typical paraneoplastic/autoimmune panels. Anti-GAD antibodies are associated with various disease including type I diabetes mellitus, various autoimmune processes, some neoplastic and infectious diseases. Thus, it is not as specific as some of the antibodies causing LE.

We are presenting two cases of isolated anti-GAD antibody-associated limbic encephalitis. Both patients were adults who developed status epilepticus and refractory seizures, cognitive impairment and mood instability. Patients' cerebrospinal fluid (CSF) and serum anti-GAD antibodies were elevated and after treatment returned to normal reference range. The diagnosis for both patients was delayed (by over one month following hospitalization), both patients required prolonged hospitalization and rehabilitation after discharge. Patient's condition improved only after immunotherapy, but required several antiepileptic drugs for seizure control. The diagnosis was more difficult in the first patient, who had numerous other medical problems including ESRD and moderately severe microvascular changes on brain imaging. In this particular patient, it was hard to appreciate any signal changes on MRI in the mesial temporal lobes given the underlying white matter disease.

We recommend inclusion of anti-GAD antibody in the paraneoplastic/encephalopathy panels in order to decrease missed cases of this important cause of LE as well as to hasten the diagnosis. This is a treatable disease, and timely diagnosis is imperative to improve outcomes.

Keywords: GAD antibodies, limbic encephalitis, seizure, autoimmune encephalitis, non-paraneoplastic limbic encephalitis.

РЕЗЮМЕ

АУТОИММУННЫЙ ЛИМБИЧЕСКИЙ ЭНЦЕФАЛИТ (СЛУЧАИ ИЗ ПРАКТИКИ)

¹Кобаидзе К., ²Харрисон А., ¹Бурклин Е., ¹Патидар В., ¹Риккарди М.

¹Университет Эмори, Медицинская школа, отделение госпитальной медицины; ²отделение неврологии, Атланта, США

Лимбический энцефалит (ЛЕ) является болезнью аутоиммунной или паранеопластической природы, который поражает медиальные отделы височных долей. Основными симптомами являются нарушения когнитивных функций, психические расстройства и судороги. Аутоиммунный ЛЭ сложно диагностировать, поскольку он не всегда включен в типичные паранеопластические/аутоиммунные панели. Антитела к глутаматдекарбоксилазе (анти-GAD) связаны с различными заболеваниями, включая сахарный диабет I типа, аутоиммунные процессы, некоторые неопластические и инфекционные заболевания. Таким образом, они не так специфичны, как некоторые антитела, вызывающие ЛЭ.

Описаны два случая изолированного лимбического энцефалита, ассоциированного с анти-GAD: у мужчины 60 лет и женщины 30 лет, у которых развился эпилептический статус и рефрактерные судороги, когнитивные нарушения и нестабильность настроения. Показатели антител к глутаматдекарбоксилазе в цереброспинальной жидкости и сыворотке были увеличены, однако после лечения вернулись к нормальному уровню. Диагноз у обоих пациентов поставлен спустя месяц после госпитализации, оба нуждались в реабилитации после выписки. Состояние пациентов улучшилось только после иммунотерапии, однако потребовалось несколько противосудорожных препаратов с целью контроля судорог. У мужчины постановка диагноза усложнялась наличием множества медицинских проблем, включая конечную стадию заболевания почек и умеренно тяжелые микрососудистые изменения мозга. Базовое заболевание белого вещества затрудняло оценку изменений сигнала на МРТ в мезиальных височных долях.

Авторы рекомендуют включить анти-GAD в панели паранеопластики/энцефалопатии с целью достижения своевременной диагностики и улучшения результатов лечения.

რეზიუმე

აუტოიმუნური ლიმბური ენცეფალიტი (შემთხვევები პრაქტიკიდან)

¹ქ. კობაიძე, ²ა. ჰარისონი, ¹ე. ბურკლინი,
¹ვ. პატიდარი, ¹მ. რიკარდი

¹ემორის უნივერსიტეტი, სამედიცინო სკოლა, პოს-პიტალური მედიცინის განყოფილება; ²ნევროლოგიის განყოფილება, ატლანტა, აშშ

ლიმბური ენცეფალიტი (LE) აუტოიმუნური ან პარანეოპლაზიური ბუნების დაავადებაა, რომელიც საფეთქლის წილების მედიალურ უბნებს აზიანებს. პაციენტს, ჩვეულებრივ, აღენიშნება კოგნიტიური ფუნქციის დარღვევა, ფსიქიური დარღვევები და კრუნჩხვები. აუტოიმუნური ლიმბური ენცეფალიტის დიაგნოზის დასმა რთულია, რადგან ის ყოველთვის არ ჯდება პარანეოპლაზიურ/აუტოიმუნურ პანელაში. ანტი-GAD ანტისხეულები სხვადასხვა დაავადებთან ასოცირდება. მათ შორისაა I ტიპის დიაბეტი, სხვადასხვა აუტოიმუნური პროცესი, ზოგიერთი ნეოპლაზიური და ინფექციური დაავადება. ამდენად, ის არ არის ისეთი სპეციფიკური, როგორც LE-ის გამომწვევი ზოგიერთი ანტისხეული.

წარმოგიდგინოთ ანტი-GAD ანტისხეულებთან ასოცირებული იზოლირებული ლიმბური ენცეფალიტის ორ შემთხვევას. ორივე პაციენტი არის ზრდასრული. მათ განუვითარდათ ეპილეფსიური სტატუსი და რეფრაქტერული გულყრები, კოგნიტური დარღვევები და ხასიათის არასტაბილურობა. ცერებროსპინალურ სითხესა და შრატში აღენიშნებოდათ მომატებული ანტი-GAD ანტისხეულები, რომელთა ტიტრი მკურნალობის შედეგად ნორმალშია. ორივე შემთხვევაში დიაგნოზის დასმა დაგვიანდა (დიაგნოზი დაისვა პოსპიტალური დაახლოებით ერთი თვის შემდეგ). ორივე პაციენტს დასჭირდა ხანგრძლივი პოსპიტალიზაცია და გაწერის შემდგომი რეაბილიტაცია. პაციენტთა მდგომარეობა გაუმჯობესდა მხოლოდ იმუნოთერაპიის შემდეგ. გულყრების კონტროლისთვის საჭირო გახდა რამდენიმე ანტიეპილეფსიური წამლის მიცემა. დიაგნოზის დასმა უფრო რთული იყო პირველი პაციენტის შემთხვევაში, რომელსაც სხვა სამედიცინო პრობლემებიც აღენიშნებოდა.

ავტორები იძლევიან რეკომენდაციას, ანტი-GAD ანტისხეულები ჩაირთოს პარანეოპლაზიურ/ენცეფალოპათიის პანელაში, რაც შეამცირებს LE-ის ამ მნიშვნელოვანი გამომწვევის დაკარგული შემთხვევების რაოდენობას და დააჩქარებს სწორი დიაგნოზის დასმას. აღნიშნული დაავადება ექვემდებარება მკურნალობას და დროული დიაგნოსტიკა მნიშვნელოვნად აუმჯობესებს გამოსავალს.

ИССЛЕДОВАНИЕ ЛИПИДОВ ПЛОДОВ МЕЛКОГО ОРЕХА (CORYLUS AVELLANA L.), ПРОИЗРАСТАЮЩЕГО В ГРУЗИИ

Кикалишвили Б.Ю., Горгаслидзе Н.С., Зурабашвили Д.З.,
Сулаквелидзе Ц.П., Малания М.А., Турабелидзе Д.Г.

*Тбилисский государственный медицинский университет, Институт фармакохимии им. И. Кутателадзе;
Центр психического здоровья и профилактики наркомании, Тбилиси, Грузия*

Мелкий орех (лесной орех, лещина обыкновенная, *Corylus avellana* L.) относится к семейству березовых (Betulaceae), является однодомным высоким кустарником (2,6-4,0 метр высотой). Живет до 100 лет, цветет в марте - апреле. Плоды собирают в период полной зрелости (август - сентябрь). Плод - деревянистый

орех диаметром 1,0-1,5 см, темнокоричневого цвета, окруженный листовидной оболочкой.

Орешник широко распространен в лесах, перелесках и равнинных участках Европы и Азии. Флора Грузии богата растениями этого семейства и широко пред-

ставлена, в основном, на территории западных районов Грузии.

Энергетическая ценность лесного ореха составляет 628 ккал, из них: белков 59 ккал., жиров 541 ккал., углеводов 28 ккал. Пищевую ценность на 100 гр съедобной части составляют белки (14,95 гр), жиры (60,75 гр), углеводы (7,0 гр). Ядра плодов содержат белки, сахарозу, стерины, токоферолы, фосфолипиды, каротиноиды, широкий спектр витаминов (В, С, Е, РР), элементы: фосфор, медь, калии, кальции. Кора и листья лесного ореха содержат дубильные вещества, эфирные масла. Листья богаты флавоноидами, алкалоидами, пальмитиновой кислотой, каротином и витамином С. С лекарственной целью используют плоды, кору и листья лесного ореха. Кору заготавливают весной во время сокодвижения и в дальнейшем сушат в открытом помещении. Листья собирают в мае, плоды – в период полной зрелости [3,6].

Согласно данным народной медицины, масло плодов лесного ореха плодотворно влияет как на сухую, так и жирную кожу, легко впитывается и стягивает поры. Имеет ярко выраженное вяжущее свойство. Считается, что масло плодов лесного ореха обладает смягчающим и регенерирующим действием, так как выравнивая кожу, питает и восстанавливает функциональное состояние водно-липидного барьера. Все эти данные четко свидетельствуют о позитивном влиянии масла плодов ореха на процессы гидратации кожи. Вместе с этим, в коже наблюдается позитивный сдвиг углеводного метаболизма. Является одним из лучших масел при проблемах кожи с угревой сыпью [1].

Плоды обладают активным иммуностимулирующим свойством, способствуют выработке антител, полезны при воспалении предстательной железы, болезнях печени, почек, гипертонии, атеросклероза, желчнокаменной болезни, астении, ревматизме, тяжелых инфекционных заболеваниях, стимулируют рост и физическое развитие детей [1].

Рядом авторов [6,11] проведен качественный и количественный анализ масла плодов мелкого ореха, произрастающего в европейских странах. Известно, что климато-экологические характеристики (особенности почвы, температурные колебания, характер освещения, влажности и т.д.) значительно меняет качественный и количественный состав растительных масел [7,8].

Анализ липидного состава масла, экстрагированного из плодов мелкого ореха, произрастающего в Грузии, не проводился.

Целью исследования явился анализ липидного состава плодов ореха мелкого (*Corylus avellana* L.) произрастающего в Грузии.

Материал и методы. Объектом исследования являются плоды ореха мелкого, культивированного в западных областях Грузии (Имеретинский район). Плоды собраны в период полной зрелости.

С целью выделения нейтральных липидов сухие плоды трижды экстрагировали при комнатной температуре н-гексаном (соотношение 1:5). Извлечения объединяли, органический растворитель отгоняли в вакуум-ротационном аппарате. Получали маслянистую массу желтоватого цвета с выходом до 60,0% по отношению к воздушно-сырому сырью.

Осуществляли разделение методом тонкослойной хроматографии на пластинках, покрытых силикагелем LS 5/40. Использованы системы: петролеинный эфир – диэтиловый эфир - уксусная кислота (85:14:1) и гексан - диэтиловый эфир (1:1). Пластинки проявляли 30% раствором серной кислоты, нагреванием или парами иода. В сумме нейтральных липидов масла плодов *Corylus avellana* L. качественно идентифицированы углеводороды, триацилглицериды, свободные жирные кислоты и стерины.

Стандартными методами определяли физико-химические константы масла: установлено, что кислотное число находится в пределах 2-3 мг КОН, число омыления в интервале 180-200 мгКОН/г, иодное число в пределах 100-108, коэффициент преломления n_d^{20} - 1,460, удельный вес d_4^{20} - 0,94.

Из остатков шрота выделены полярные липиды с суммарным выходом 1,2%. После четырехкратного последовательного экстрагирования хлороформ – метанолом (2:1) экстракты объединяли, сгущали в вакуум-ротационном испарителе при температуре 60,0°C. На покрытых силикагелем LS 5/40 пластинках осуществлено двухмерное разделение. Подвижные фазы: хлороформ-метанол-25,0% аммиак (65:30:5), и хлороформ – метанол-ледяная уксусная кислота – вода (170:25:25:6). Хроматограммы проявляли раствором Васьковского или парами иода, обнаружены соединения с Rf-0,86; Rf-0,66; Rf-0,54; Rf-0,37; Rf-0,18.

Методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на хроматографе РТС-1 качественно и количественно идентифицированы жирные кислоты (Детектор рефрактометрический R-401, Waters). Разделение проведено на металлической колонке (300,0x3,0 мм), заполненной обращенной фазой μ -Вондопак C_{18} . Элюенты: 1) метанол-вода (2:1)+0,1% раствор уксусной кислоты; 2) тетрагидрофуран – ацетонитрил – вода (4:7:9) + 0,1% раствор уксусной кислоты. Расход-2,0 мл, мин (2, 4, 5).

Результаты обработаны с использованием программы OASIS-740 v.4.

Результаты и их обсуждение. В полярных липидах качественно и количественно идентифицированы следующие фосфолипиды: лизофосфатидилхолин (Rf-0,18; в количестве 5,46%); лизофосфатидилэтаноламин (Rf-0,37; в количестве 12,2%); фосфатидилхолин (Rf-0,54; в количестве 39,6%); фосфатидилэтаноламин (Rf-0,66; в количестве 27,6%); N-ацилфосфатидилэтаноламин (Rf-0,86; в количестве 3,12%) и неидентифицированный Rf-0,60. В сумме полярных липидов фосфолипиды определяли по содержанию неорганического фосфора спектрофотометрическим методом.

Качественно идентифицированы также биологически значимые аминокислоты: лизин (Rf-0,12); пролин (Rf-0,24); серин (Rf-0,27); глицин (Rf-0,32); цистеин (Rf-0,34); валин (Rf-0,43); фенилаланин (Rf-0,56).

На основании качественного анализа установили сложный жирнокислотный состав масла плодов мелкого ореха, произрастающего в Имерети.

Согласно проведенному хроматографическому анализу в масле плодов ореха мелкого качественно идентифицированы десять высших жирных кислот с временем удерживания от 4,01 минуты до 13,00 минут. На 15,0 минуте хроматографический процесс исследования был прекращен.

Опираясь на приведенные в таблице данные, масло плодов ореха мелкого содержит насыщенные, ненасыщенные и полиненасыщенные высшие жирные кислоты.

Согласно времени удерживания насыщенные жирные кислоты идентифицированы в следующем порядке: додекановая (на 4,01 минуте), тетрадекановая (на 5,00 минуте), гексадекановая (на 5,68 минуте), октадекановая (на 7,51 минуте), эйкозановая (на 11,01 минуте), докозановая (на 12,00 минуте) и тетракозановая (на 13,00 минуте удерживания) (таблица).

Таким образом, в масле плодов ореха мелкого качественно идентифицировано семь насыщенных

жирных кислот. На 8,01 минуте удерживания идентифицирована октадецен-9-овая кислота. Необходимо подчеркнуть, что присутствие мононенасыщенных жирных кислот в масле плодов ореха мелкого оказалось единственным. В отличие от мононенасыщенных кислот, в масле плодов ореха мелкого качественно идентифицированы две полиненасыщенные жирные кислоты с временем удерживания на 8,51 минуте (октадекадиен-9,12-овая) и на 9,01 минуте удерживания – октадекатриен-9,12,15-овая (таблица).

Таким образом, согласно качественному хроматографическому анализу, масло плодов ореха мелкого, культивированного в западной области Грузии, содержит семь насыщенных, одну мононенасыщенную и две полиненасыщенные высшие жирные кислоты.

Проведенный количественный хроматографический анализ масла плодов ореха мелкого, культивированного в западной области Грузии, выявил следующую зависимость: масло плодов ореха мелкого в доминирующем количестве содержало мононенасыщенную кислоту: октадецен-9-овую в количестве $80,61 \pm 1,3$ мг%. А также в сравнительно большом количестве полиненасыщенную кислоту октадекадиен 9,12-овую в количестве $14,28 \pm 1,2$ мг%. Проведенный статистический анализ четко подтвердил количественное превосходство содержания октадецен-9-овой кислоты в масле исследованных плодов ($p < 0,001$).

Как было показано выше, в масле плодов ореха мелкого качественно и количественно идентифицирована также еще одна полиеновая кислота: октадекатриен-9,12,15-овая. Однако, ее содержание по сравнению с другими полиеновыми кислотами оказалось весьма мизерным, не превышая $0,12 \pm 0,01$ мг%. Вариационно-статистический анализ подтверждает достоверность различия ($p < 0,001$).

Из класса ненасыщенных жирных кислот четко доминировала гексадекановая кислота. Ее уровень достиг

Таблица. Жирные кислоты масла плодов *Corylus Avellana L* (мг%)

кислоты	время удерживания (мин)	структура пиков		содержание мг%
		характер	площадь (мм ²)	
додекановая	4,01	L	7980	0,10±0,01
тетрадекановая	5,00	HL	279916	0,10±0,01
гексадекановая	5,68	F	108258	5,10±0,10
октадекановая	7,51	HL	731030	1,65±0,09
октадецен-9-овая	8,01	L	593280	80,61±1,3
октадекадиен-9,12,-овая	8,51	F	1307785	14,28±1,2
октадекатриен-9,12,15-овая	9,01	EF	557098	0,12±0,01
эйкозановая	11,01	L	100883	0,18±0,01
докозановая	12,00	F	607676	0,10±0,01
тетракозановая	13,00	HL	69856	0,11±0,01

5,10±0,10 мг%. В значительно меньшем количестве присутствует октадекановая кислота. Различие статистически достоверно (5,10±0,10 мг% и 1,65±0,09 мг%, $p < 0,001$, соответственно).

Уровень остальных идентифицированных в масле плодов ореха мелкого насыщенных жирных кислот оказался исключительно мизерным. Однако, содержание насыщенной кислоты (эикозановой) достоверно превышало содержание полиненасыщенной (октадекатриен-9,12,15-овой) кислоты. Соответственно имеем 0,18±0,01 мг% и 0,12±0,01 мг%. Различие статистические достоверно $p < 0,01$.

Уровень остальных насыщенных кислот, идентифицированных в масле плодов ореха мелкого оказался исключительно незначительным, а именно: додекановой – 0,10±0,01 мг%, тетрадекановой – 0,10±0,01 мг%; докозановой – 0,10±0,01 мг% и тетракозановой – 0,11±0,01 мг%.

Согласно скрининговому анализу, по качественному составу высших жирных кислот (от $C_{12:0}$ до $C_{24:0}$), исследованное нами масло плодов ореха мелкого, произрастающего в западных районах Грузии, по общей композиции соответствует таковому, экстрагированному из растений того же вида, произрастающих в других эко-географических условиях [7].

Вместе с этим, хорошо известно, что жирнокислотная композиция масел значительно меняется в зависимости от района произрастания, метеорологических условий созревания, агротехнических мероприятий и т.д. Поэтому, композиция жирнокислотного состава растений одного и того же вида четко характерны для каждой конкретной области произрастания [5].

Жирнокислотный состав исследованного масла плодов ореха мелкого, произрастающего в Грузии, по количественному содержанию ненасыщенных жирных кислот (от $C_{12:0}$ до $C_{24:0}$) достаточно четко отличается от масел плодов орешников, произрастающих в других эко-географических природных условиях [10].

Различие заключается, в первую очередь, в содержании гексадекановой кислоты, которая в масле плодов орешника, произрастающего в Грузии достигает 5,10±0,10 мк% и значительно превышает данные, приведенные [8] касательно масла, добытого из плодов орешника, произрастающего на территории средней Европейской полосы.

Содержание остальных жирных кислот, идентифицированных в исследуемом масле мелкого ореха (Грузия), по количественному составу также значительно отличается от данных приведенных в работах [7,8].

Уровень гексадекановой кислоты намного превышает уровень остальных насыщенных кислот, идентифицированных в масле плодов мелкого ореха. Указанное обстоятельство отличает структуру масла мелкого ореха, произрастающего в Грузии от композиции других масел, где чаще доминирует уровень октадекановой кислоты.

Общая численность идентифицированных нами насыщенных жирных кислот в масле плодов мелкого ореха значительно преобладает над общей численностью ненасыщенных (моно- и полиеновых) жирных кислот.

Согласно экспертной классификации (для жирных кислот, полученных из семян и для жирных кислот, полученных из мякоти плодов), исследованное нами масло плодов мелкого ореха, произрастающего в Грузии, относится к жидким растительным маслам группы олеиновых (четвертая категория по экспертной классификации масел) [4].

По составу преобладающих жирных кислот, содержание которых должно превышать 20,0% от общей массы (такие кислоты в экспертной практике принято называть «главными»), исследованное нами масло плодов ореха мелкого, произрастающего в Грузии, содержит свыше 80,0% октадецен-9-ового компонента и не более 14,0% октадекадиен-9,12-овой кислоты, а также небольшое количество насыщенных кислот.

Масла этой категории не высыхают на воздухе (в тонком слое) и потому не образуют пленок. Пленки формируются только после предварительного растирания с небольшим количеством свинцового сурика [4].

Среди жирных кислот растительных масел наибольшую биологическую ценность представляют ненасыщенные кислоты. Большинство растений и их плоды содержат, в основном, октадецен-9-овую и октадекадиен-9,12-овую кислоты. Незаменимые кислоты биологически весьма значимы, они, наравне с другими полиеновыми кислотами, ответственны за текучесть мембран, предотвращая их затвердевание при пониженной температуре [2].

Высшие полиненасыщенные жирные кислоты влияют положительно на функциональное состояние печени, миокарда, принимают участие в фибринолитической активности крови, проявляют определенное цитостатическое и особенно гипохолестеринемическое действие. Октадекадиен-9,12-овая кислота является исключительно активным природным соединением, снижающим уровень холестерина в крови, способствует растворению холестериновых бляшек, нормализации кровяного давления [9].

В настоящее время исключительно актуален вопрос роли и значения октадекадиен-9,12-овой кислоты в онкологической практике. Значимая противоопухолевая роль этой кислоты в качестве «растворителя» для канцерогенов и в торможении развития опухолевых процессов подчеркивалась рядом авторов [9], которые указывают на возможность противоопухолевой активности полиеновых кислот. Однако, большинство полиеновых кислот эффективны только в условиях кислой среды. Исключение представляет октадекадиен-9,12-овая и октадекатриен-9,12,15-овая кислоты, которые сохраняют противоопухолевую активность в среде с нейтральной величиной pH. Октадекатриен-9,12,15-овая кислота обладает более высокой противоопухолевой активностью.

С точки зрения биофармации, наибольший интерес представляют масла, в которых ненасыщенные высшие жирные кислоты имеют доминирующую роль.

Извлеченное масло из плодов, произрастающего в Грузии мелкого ореха, по структуре и количественному составу высших жирных кислот, достаточно четко отличается от масел, извлеченных из плодов соответствующих растений, произрастающих в других эко-географических условиях.

Уникальный набор физиологически активных компонентов, их благоприятное соотношение формируют определенный интерес не только к разработке и изготовлению различных косметических и парфюмерных средств, но и в аспекте медико-фармакологических задач, выполнимых на базе масла семян ореха мелкого, произрастающего в Грузии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Губанов И.А. и др. Лещина обыкновенная или Орешник. Лесной орех. Науч. Изд. КМК. Институт технологии. М.: 2003; 2: 33-38.
2. Дейненка В.И., Дейненка Л.А., Ермаков А.М. и др. Исследование триглицеридов семян Lamiaceae методом ВЭЖХ. Химия природных соединений 2004; 5: 341-343.
3. Еленовский А.Г., Соловьева М.П., Тихомиров В.И. Батарника. Систематика высших или наземных растений. М.: 2004; 420.
4. Карлин И.П., Семкин Е.П. Определение вида жира методом газовой хроматографии. М: Мин. юстиции и судебной экспертизы. Методическое письмо: 2000; 50.
5. Кикалишвили Б.Ю., Зурабашвили Д.З., Сулаквелидзе Ц.П., Маланя М.А., Турабелидзе Д.Г. Исследование липидов семян *Vitex agnus castus* L, произрастающих в Грузии. Мед. Новости Грузии 2016; 7-8: 77-81.
6. Мовсумов Н. Юсифова Д.Ю., Гараев Э.А. Биологи-

чески активные вещества *Corylus Avellana* L, произрастающие в Азербайджане. Химия растительного сырья 2013; 4: 259-261.

7. Скварцов В.Э. Флора Средней России. М.: 2003; 488.
8. Шанцер И. А. Растения средней полосы Европейский России. М.: 2007; 469.
9. "Papers of International Research-Practice Conference", Pharmacy of Kazakhstan: Integration of Science, Education and Production. Shemkent Kazakhstan: 2009; 285.
10. Dhellot G., Matouba E. Extraction chemical composition nutrition characterization of vegetable oils. African Biotechnol. 2006; 5(11): 1095-1101.
11. Spongord R.Y., Sun M. Enhancement of an analytical method for the determination oils in vaccine adsorbed formulations. J. Pharm/ Biomed. Anal. 2008; 52: 554-564.

SUMMARY

STUDY OF LIPIDS OF THE FRUITS OF USUAL HAZEL-NUT *CORYLUS AVELLANA* L., GROWING IN GEORGIA

Kikalishvili B., Gorgaslidze N., Zurabashvili D., Sulakvelidze Ts., Malania M., Turabelidze D.

Tbilisi State Medical University, Kutateladze Institute of Pharmacochimistry; Center of Mental Health and Prevention of addiction; Tbilisi, Georgia

The aim of this investigation was the study of lipids from the fruits of usual hazel-nut *Corylus avellana* L, growing in Georgia. Ripe fruits was collected in the West Georgia, just in Imereti. From the powdered fruits was obtained the sums of neutral and polar lipids. Qualitatively there were established classes entered in them.

By using High performance liquid chromatography qualitatively and quantitatively were identified ten fatty acids, which time of deduction hesitate from 4,01 min to 13,00 min. By the analyses there were determined unsaturated fatty acids $C_{12:0}$ to $C_{24:0}$. The content of unsaturated fatty acids considerably is distinguished from the content of the oil from the hazel-nut, growing in the other eco-geographical conditions. In the oil of the hazel-nut growing in Georgia content of hexadecanoic acid is by far exceeded (surpassed) than of the oil from the nut growing in the other natural conditions. In the other matters dominant acid is octadecanoic acid.

The oil from the fruits of hazel-nut content physiologically active compounds, which desirably correlation is interesting not only for receiving (obtaining) cosmetic means, not is important for usage in practical medicine.

Keywords: *Corylus avellana* L, lipids, free fatty acids, phospholipids.

РЕЗЮМЕ

ИССЛЕДОВАНИЕ ЛИПИДОВ ПЛОДОВ МЕЛКОГО ОРЕХА (*CORYLUS AVELLANA L.*), ПРОИЗРАСТАЮЩЕГО В ГРУЗИИ

Кикалишвили Б.Ю., Горгаслидзе Н.С.,
Зурабашвили Д.З., Сулаквелидзе Ц.П.,
Малания М.А., Турабелидзе Д.Г.

Тбилисский государственный медицинский университет, Институт фармакохимии им. И. Кутателадзе; Центр психического здоровья и профилактики наркомании, Тбилиси, Грузия

Целью исследования явился анализ липидного состава плодов ореха мелкого (*Corylus avellana L.*), произрастающего в Грузии. Собраны плоды ореха мелкого, в западных областях Республики (Район Имерети) в период полной зрелости; из них получены нейтральные липиды и методом высокоэффективной жидкостной хроматографии качественно и количественно идентифицированы десять жирных кислот с временем удерживания от 4,01 до 13,00 минут. Согласно качественному анализу исследованных масел на содержание ненасыщенных жирных кислот (от $C_{12:0}$ до $C_{24:0}$) они четко отличаются от масел плодов орешников, произрастающих в других эко-географических природных условиях. Различие заключается в содержании гексадекановой кислоты, которая в масле плодов орешника, произрастающего в Грузии значительно превышает уровень гексадекановой кислоты масла плодов орешника, собранных в других эко-географических природных условиях. Кроме того, уровень гексадекановой кислоты намного превышает уровень остальных идентифицированных в масле насыщенных кислот. Указанное обстоятельство характеризует состав масла плодов мелкого ореха, произрастающего в Грузии в отличие от композиции других масел, где чаще доминирует уровень октадекановой кислоты. По составу преобладающих жирных кислот, исследованное нами масло относится к жидким растительным маслам группы октадецен-9-овой и содержит свыше 80,0 мг% октадецен-9-овая компонента и не более 14,0 мг% октадекатриен-9,12,15-овая. Уникальный набор физиологически активных компонентов и их благоприятное сочетание вызывает высокий интрес не только к разработке и изготовлению различных косметических и парфюмерных средств, но и в аспекте

медико-фармакологических задач, выполняемых на базе масла плодов ореха мелкого произрастающего в Грузии.

რეზიუმე

საქართველოში მოზარდი ჩვეულებრივი თხილის (*Corylus avellana L.*) ნაყოფის ლიპიდების შესწავლა

ბ. კიკალიშვილი, ნ. გორგასლიძე, დ. ზურაბაშვილი, ც. სულაქველიძე, მ. მალანია, დ. ტურაბელიძე

თბილისის სახელმწიფო სამედიცინო უნივერსიტეტი, ი. ქუთათელაძის ფარმაკოქიმიის ინსტიტუტი; ფსიქიკური ჯანმრთელობის და ნარკომანიის პრევენციის ცენტრი, თბილისი, საქართველო

კვლევის მიზანს წარმოადგენდა საქართველოში მოზარდი ჩვეულებრივი თხილის - *Corylus avellana L.* - ნაყოფის ლიპიდების კვლევა. მწიფე ნაყოფი შეგროვებულია დასავლეთ საქართველოში, კერძოდ - იმერეთში. დაწვრილმანებული ნაყოფიდან მიღებულ იქნა ნეიტრალური და პოლარული ლიპიდების ჯამი. თვისობრივად დადგენილ იქნა მათში შემავალი კლასები.

მაღალეფექტური სითხური ქრომატოგრაფიული მეთოდის გამოყენებით თვისობრივად და რაოდენობრივად იდენტიფიცირებულია ათი ცხიმოვანი მჟავა, რომელთა შეკავების დრო მერყეობს 4,01 წთ-დან 13,00 წუთამდე. ანალიზით დადგენილია ცხიმოვანი მჟავების არსებობა $C_{12:0}$ -დან $C_{24:0}$ -მდე. ავტორების მიერ მიღებულ ზეთში შემავალი უჯერი ცხიმოვანი მჟავების შემადგენლობა მნიშვნელოვნად განსხვავდება სხვა ეკოგეოგრაფიულ პირობებში მოზარდი თხილის ზეთის შემადგენლობისაგან; კერძოდ, ქართული თხილის ზეთში ჰექსადეკანისმჟავას შემცველობა ბევრად აღემატება სხვა ბუნებრივ პირობებში მოზარდი თხილის ზეთში ამავე მჟავას შემცველობას და, ამასთანავე, მასში დომინირებს ოქტადეკანის მჟავა. ჩვეულებრივი თხილის ნაყოფის ზეთი შეიცავს უნიკალურ ფიზიოლოგიურად აქტიურ კომპონენტებს, რომელთა კეთილსაიმედო თანაფარდობა საინტერესო და მნიშვნელოვანია არამარტო კოსმეტიკური საშუალებების შემუშავებისა და დამზადებისათვის, არამედ პრაქტიკულ მედიცინაში გამოსაყენებლადაც.

ИССЛЕДОВАНИЕ ЦИТОТОКСИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ МЕТАНОЛЬНЫХ ЭКСТРАКТОВ ЭНДЕМИЧНЫХ ВИДОВ РАСТЕНИЙ РОДА ERYSIMUM АДЖАРСКОГО ФЛОРИСТИЧЕСКОГО РАЙОНА ГРУЗИИ

Беридзе Д.Н., Метревели М.В., Джохадзе М.С., Бакуридзе К.А., Берашвили Д.Т., Бакуридзе А.Д.

Тбилисский государственный медицинский университет, Грузия

Изучение эндемичных видов растений Аджарии вызывает особый интерес после открытия границы с соседним государством – Турцией. После того как Грузия стала связывающим коридором Европы и Азии, существующие раньше географические преграды для растительного мира ныне легко преодолимы. Исходя из этого, исследование растительности Аджарии и соседнего исторического Лазистана - трансграничной зоны Грузии с Турцией весьма актуально.

На сегодняшний день учеными ботаниками выявлено 27 эндемичных видов растений локального распространения в Аджарии и трансграничной зоне с Турцией. Из них 8 видов характерны только для флористического района Аджарии, остальные 19 видов имеют трансграничное распространение.

Целью исследования явилось изучение цитотоксической активности метанольных экстрактов из эндемичных видов растений Аджарии и Аджарии-Лазистана.

Материал и методы. Объектами исследования явились эндемичные виды растений Аджарий: *Allium adzharicum* M. Pop., *Angelica adzharica* M. Pop., *Centaurea adzharica* Sosn., *Erysimum contractum* Somm. Et Levier., *Psoralea acaulis* var. *adzharica*, *Ranunculus ampelophylus* var. *adzharica*, *Rubus adzharicus* Sanadze, Эндемичные виды растений Аджарии - Лазистана: *Amaracus rotundifolius* (Boiss.) Briq., *Astragalus adzharicus* M. Pop., *Astragalus sommieri* Freyn., *Hypericum nordmanni* Khokhr., *Hypericum ptarmicifolium* var. *adzharicum*, *Linaria adzharica* Kem.-Nath., *Osmanthus decorus* (Boiss. et Bal.), *Primula megasaefolia* Boiss. Et Bal., *Quercus petra* var. *dshorochensis* c. Koch., *Rhododendron smirnovii* Trautv., *Rhododendron ungerii* Trautv., *Rhynchospora caucasica* Vahl., *Scrophularia chloranta* Kyet Boiss., *Scrophularia sosnovskyi* Kem.-Nath., *Scutellaria pontica* C. Koch., *Seseli foliosum* (Somm. Et Lev.) Mand.

Осуществлены экспедиции от побережья до высокогорных регионов Аджарии в июле 2014 года. Исследуемые растения были собраны в фазу цветения.

В процессе исследования использованы красители, трипсин, соли, растворители и детергенты фирмы Sigma-Aldrich (Италия), реактив PrestoBlue™ Reagent фирмы Invitrogen (США), ростовая среда ДМЕМ фирмы Lonza (Бельгия), эмбриональная сыворотка фирмы Gibco (США).

Проведено изучение метанольной фракции:

Тип экстракта	Навеска, мг	Количество ДМСО, мл	Концентрация
Метанольная фракция	52	0,35	150 мг/мл

Изучение клеточных тестов культуры.

Клеточная линия аденокарциномы молочной железы человека MCF-7

- Происхождение: человек, аденокарцинома молочной железы (плевральная жидкость).
- Морфология: эпителиоподобная.
- Условия культивирования: среда - ДМЕМ, сыворотка эмбриональная бычья 10%, 100 мкг/мл стрептомицин, 100 U/мл пенициллина, пируват Na 1mM.
- Процедура посева - снятие клеток, используя трипсин 0.25%. Оптимальная плотность 2.0-4.0x10⁴ клеток/см².
- Криоконсервация - ростовая среда, 8-9% DMSO, 1.0x10⁶ клеток/мл в ампуле. Жизнеспособность после криоконсервации: 94% (окраска трипановым синим на нулевом пассаже).
- Контроль контаминации: бактерии, грибы и микоплазма не обнаружены.
- Источник получения клеточной линии: Университет Западного Онтарио, Канада.

Клеточная линия кератиноциты человека HaCaT

- Происхождение: получены доктором Norbert E. Fusenig, Heidelberg (Германия) из спонтанно трансформированных эпителиальных клеток кожи взрослого человека, способны полноценно дифференцироваться и образовывать многорядные упорядоченные пласты.
- Морфология: кератиноподобная.
- Условия культивирования: среда - ДМЕМ, сыворотка эмбриональная бычья 10%, 100 мкг/мл стрептомицин, 100 U/мл пенициллина, пируват Na 1mM.
- Процедура посева - снятие клеток дважды в неделю при 70-80% монослое, используя трипсин 0.25%, оптимальная плотность 1.0x10⁴ клеток/см².
- Криоконсервация - ростовая среда, 10% DMSO, 1.0x10⁶ клеток/мл в ампуле. Жизнеспособность после криоконсервации: 90% (окраска трипановым синим на нулевом пассаже).
- Контроль контаминации: бактерии, грибы и микоплазма не обнаружены.
- Источник получения клеточной линии: лаборатория тканевой инженерии и физиопатологии кожи, Институт Дерматологии, Виа Монти диКрета, Рим, Италия.

Общая схема проведения экспериментов.

Кератиноциты NaCaTi клетки MCF 7 культивировали в модифицированной среде Игла – DMEM, содержащей 10% эмбриональную телячью сыворотку. Клетки растили в стандартных условиях (37°C, 5% CO₂), экспозицию с исследуемыми веществами проводили в 24- или 96-луночных планшетах. Выживаемость и способность к пролиферации культивируемых клеток определяли с помощью реактива PrestoBlue™ Reagent (Invitrogen, США). Степень повреждения клеток оценивали методом исключения красителя (трипановый синий). Для выявления типа клеточной гибели использовали флуоресцентную микроскопию и дифференциальное окрашивание ДНК системой акридин оранжевый/этидиум бромид.

Определение количества клеток.

Для снятия клеток использовали 0,05% трипсин. После открепления суспензию клеток переносили в 50 мл пробирку, содержащую полную ростовую среду в объеме, четырехкратно превышающем объем раствора трипсина. Центрифугировали 10 мин. при 1500 об/мин. Клетки ресуспензировали в полной ростовой среде. Количество клеток в суспензии считали в гемоцитометре (камера Горяева), количество жизнеспособных клеток - методом исключения красителя. Для этого в клеточные суспензии добавляли 0,1% трипановый синий в равном объеме.

Определение пролиферативной активности и жизнеспособности клеток.

Прролиферативную активность и жизнеспособность клеток определяли в 96-луночных планшетах, используя реактив PrestoBlue™ (Invitrogen, США), содержащий нефлуоресцентный компонент голубого цвета - резазурин, который модифицируется жизнеспособными клетками в высокофлуоресцентное соединение красного цвета. PrestoBlue™ Reagent разводили в культуральной среде (1:9) и добавляли к клеткам в количестве 100 мкл/лунка. Перед добавлением PrestoBlue™ клетки отмывали 1 раз добавляя в каждую лунку по 200 мкл изотонического фосфатного буфера (ИФБ), pH 7,4. На каждом планшете оставляли лунки с культуральной средой без клеток для определения базового уровня флуоресценции. Флуоресценцию измеряли после инкубации в течение 2 ч при 37 С, используя фильтр Ex 535 нм (±25 нм), Em 615 нм (±10 нм).

Цитоморфологический анализ методом двойного окрашивания системой акридиновый оранжевый/этидиум бромид флуоресцентной микроскопии.

Цитоморфологический анализ проводили методом двойного окрашивания (тест живые-мертвые клетки) в 24-луночных планшетах. Смесь двух витальных флуоресцентных красителей акридина оранжевого (АО) и этидиум бромид (ЭБ) готовили в ИФБ: 30 мкг/мл АО и 30 мкг/мл ЭБ. Культуральную среду удаляли и заменяли

200 мкл ИФБ и 200 мкл смесью касителей. Планшеты инкубировали при комнатной температуре в темной камере в течение 20 мин, затем клетки визуализировали и фотографировали, используя флуоресцентный микроскоп Axiovert 25 (Цейс, Германия), оснащенный цифровой камерой.

Из растительного сырья готовили метанольные извлечения методом перколяции в течение 24 часов, которые фильтровали через бумажный фильтр. Фильтрат испаряли в ротационном вакуум-испарителе и сушили под вакуумом до сухого остатка.

Посредством исследования специфической цитостатической и цитотоксической активности природных и синтетических соединений получили значимую информацию об их потенциальной способности блокировать рост опухоли в результате прямого токсического воздействия на раковые клетки. При этом, ключевым моментом является избирательность действия, т.е. потенциальный противораковый препарат, должен быть значительно более токсичным по отношению к раковым клеткам, чем к нормальным. В данном разделе представлены результаты исследования метанольных экстрактов. Оценивали и сравнивали суммарный цитотоксический и цитостатический эффект в отношении культивируемых клеток аденокарциномы молочной железы MCF-7 и кератиноцитов NaCaT. Для каждого типа клеток определяли зависимость доза-эффекта, графическим методом рассчитывали концентрации, вызывающие снижение количества культивируемых клеток на 50% (ЦТД₅₀).

Результаты исследования цитостатической активности в отношении культивируемых клеток аденокарциномы молочной железы MCF-7.

Клеточная линия MCF-7 представляет собой клетки аденокарциномы молочной железы, выделенные в 1970 году из материала, полученного от 69-летней женщины с Кавказа. Аббревиатура MCF-7 происходит от названия Мичиганского ракового фогда-7 в Детройте, где в 1973 году была создана эта клеточная линия [7]. Анализ публикаций свидетельствует, что клетки линии MCF-7 и линии клеток рака молочной железы - T-47D и MDA-MB-231 использовались в большинстве исследований, посвященных изучению проблем рака молочной железы [3].

Основные характеристики клеток MCF-7:

- первичная опухоль: инвазивная карцинома протоков молочной железы;
- имеет рецепторы эстрогена;
- отвечает на эстрогены усилением пролиферации;
- имеет рецепторы прогестерона.

Эта клеточная линия сохранила некоторые характеристики дифференцированного эпителия молочных

желез, в том числе способность запускать сигнальные процессы в результате взаимодействия цитоплазматических рецепторов эстрогена с лигандом и образовывать соответствующие комплексы.

На начальном этапе исследования проводили предварительную оценку цитотоксического действия препаратов: в среду культивирования клеток MCF-7 добавляли исследуемые препараты в концентрации, различающейся на порядок, в виде раствора в ДМСО; концентрация ДМСО во всех экспериментах составляла 1%. В случае контрольного эксперимента в культуральную среду добавляли только ДМСО в концентрации 1%.

Статистическую обработку результатов производили с использованием стандартной компьютерной программы «Excel». Статистические данные представлены в виде MSD, где M – среднее арифметическое, SD – стандартное отклонение.

Результаты и их обсуждение. В результате проведенных исследований выявлен лишь один препарат (условное название «препарат 1»), обладающий цитотоксической активностью. Результаты исследования приведены в таблице 1.

В последующих экспериментах исследовали цитотоксическое действие препарата 1 в концентрациях, позволивших получить зависимости доза-эффекта и определить значения ЦТД₅₀.

Исследование цитотоксичности препарата 1 в отношении MCF-7. В этой серии экспериментов изучали влияние препарата 1 на жизнеспособность культивируемых клеток MCF-7. Установлено, что данный препарат

обладает выраженным доза-зависимым цитотоксическим действием в диапазоне концентраций 5-100 мкг/мл культуральной среды (таблица 2). На рис. 1 приведена зависимость цитотоксичности к клеткам MCF-7 от концентрации препарата 1. Используя данную кривую рассчитана концентрация, вызывающая гибель 50% клеток MCF-7 спустя 24 ч и равная 16 мкг/мл (ЦТД₅₀).

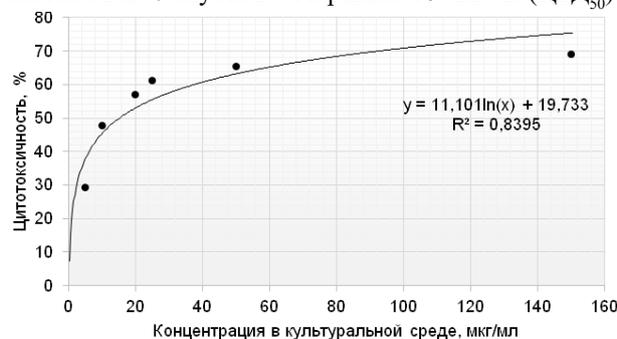


Рис. 1. Зависимость цитотоксичности к клеткам MCF-7 от концентрации препарата 1

Результаты исследования цитостатической активности в отношении культивируемых кератиноцитов человека линии HaCaT

В качестве модели кератиноцитов человека *in vitro* часто используют клеточную линию HaCaT, полученную из спонтанно трансформированных эпителиальных клеток кожи взрослого человека [1]. Клетки линии HaCaT используют для изучения процессов, происходящих в эпидермисе как в физиологическом, так и патологическом состоянии. Кератиноциты HaCaT сохраняют дифференцировочный потенциал в культуре и в определенных условиях экспрессируют классические маркеры дифференциации кератиноцитов, такие как цитокератины-1 и -10, инволюкрин и филагрин [5] Кле-

Таблица 1. Влияние различных концентраций метанольного экстракта эндемичного растения рода *Erysimum* Аджарского флористического района на жизнеспособность культивируемых клеток MCF-7

п/п	Концентрация, мкг/мл среды	Кол-во клеток отн. ед. флуор.	Кол-во клеток, %	Цитотоксичность, %
Контроль (ДМСО)	150	20,2±2,9 (n=24)	100	0
Метанольный экстракт (препарат 1)	1500	6,3±0,1 (n=8) ^{††}	31,3	69
		0,4±1,0 (n=8) ^{††*}	1,9	98

** - $p \leq 0,05$; † - $p \leq 0,001$; †† - $p \leq 0,00001$

Таблица 2. Влияние различных концентраций препарата 1 на жизнеспособность культивируемых клеток MCF-7

Концентрация, мкг/мл среды	Кол-во клеток, %	Цитотоксичность, %
0 (контроль)	100±6,9 (n=16)	-
5	70,6±4,9 [†] (n=8)	29,4
10	52,1±4,5 ^{††} (n=8)	47,9
20	42,9±5,1 ^{††} (n=8)	57,1
25	38,7±1,1 ^{††} (n=8)	61,2
50	34,8±2,6 ^{††} (n=8)	65,2
150	31,3±4,8 ^{††} (n=8)	68,7

† - $p \leq 0,001$; †† - $p \leq 0,00001$

Таблица 3. Влияние различных концентраций препарата 1 на жизнеспособность культивируемых клеток HaCaT

Концентрация, мкг/мл среды	Кол-во клеток, %	Цитотоксичность, %
0 (контроль)	100±6,9 (n=16)	-
5	61,7±10,2 [†] (n=8)	38,3
10	35,4±6,9 ^{††} (n=8)	64,6
20	20,5±5,7 ^{††} (n=8)	79,5
25	24,1±4,1 ^{††} (n=8)	75,9
50	21,8±2,8 ^{††} (n=8)	78,7

[†] - $p \leq 0,001$; ^{††} - $p \leq 0,00001$

точная линия HaCaT является подходящей моделью для изучения не только дифференциации кератиноцитов, но и пролиферативных процессов, а также апоптотической гибели клеток [8]. Клетки данной линии способны полноценно дифференцироваться и образовывать многоядные упорядоченные пласты. Это свойство делает их удобной модельной системой для изучения процессов формирования эпидермального пласта [6] и даже для формирования эпидермиса при пересадке [2]. Кроме того, кератиноциты HaCaT используют и в качестве модели воспалительных заболеваний в коже при изучении свойств продукции цитокинов [4].

Исследование цитотоксичности препарата 1 (метанольная фракция) в отношении кератиноцитов HaCaT.

В экспериментах изучено влияние препарата 1 на жизнеспособность культивируемых клеток HaCaT. Установлено, что данная фракция обладает выраженным доза-зависимым цитотоксическим действием в диапазоне концентраций 5-50 мкг/мл культуральной среды (таблица 3). На рис. 2 представлена зависимость

цитотоксичности к клеткам HaCaT от концентрации препарата 1. Посредством данной кривой рассчитана концентрация, вызывающая гибель 50% клеток HaCaT спустя 24 часа, которая составила 6 мкг/мл (ЦТД₅₀).

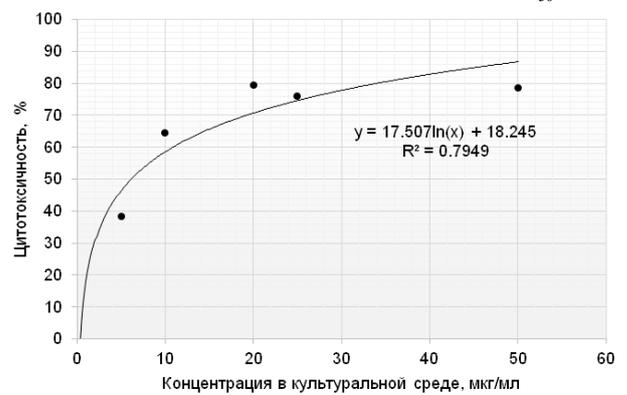


Рис. 2. Зависимость цитотоксичности к клеткам HaCaT от концентрации препарата 1

Морфологический анализ состояния клеток до и после воздействия препарата 1 представлен на рис. 1.

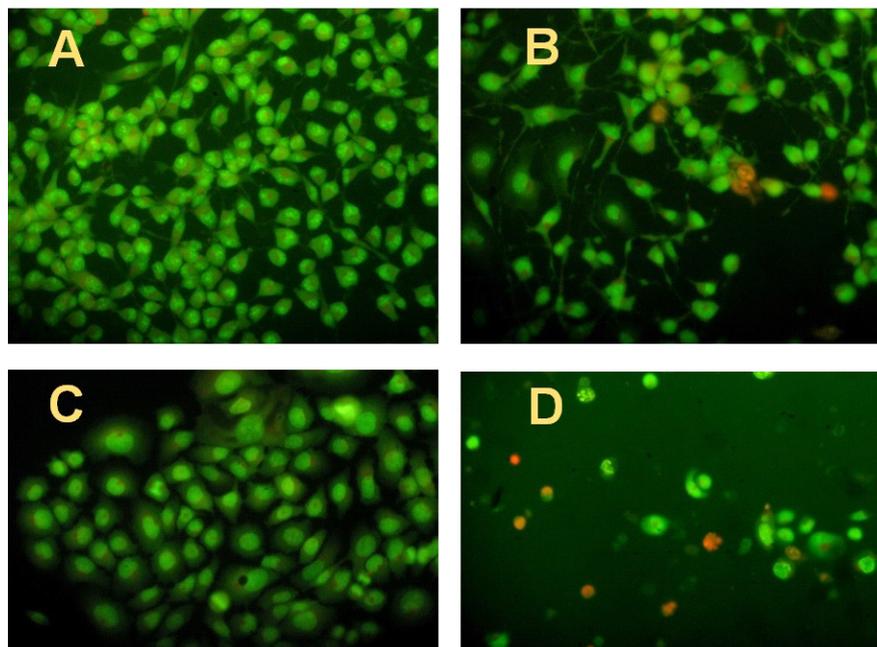


Рис. 3. Репрезентативные флуоресцентные микрофотографии клеток MCF-7 (A,B) и HaCaT (C,D) A,C - спустя 24 ч после добавления ДМСО (растворитель); B,D - спустя 24 ч после воздействия препарата 1 в дозе 25 мкг/мл с ДМСО. Окрашивание системой акридин оранжевый + этидиум бромид

Таблица 4. Концентрации препарата 1, снижающие жизнеспособность культивируемых клеток человека на 50%

Препарат	Значения ЦТД ₅₀ , мкг/мл	
	Клеточная линия MCF-7	Клеточная линия HaCaT
Препарат 1	16	6
Куркумин	2,2	4,8

Цитотоксическое действие препарата 1, оказывающее наиболее выраженное влияние по результатам анализов, проведенных с применением реактива PrestoBlue™, подтверждено стандартным тестом на живых и мертвых клетках с использованием витальных флуоресцентных красителей - акридина оранжевого и этидиум бромид.

В экспериментах к культивируемым в 24-луночных планшетах клеткам добавляли метанольный экстракт (препарат 1) из расчета 25 мкг/мл культуральной среды. Спустя 24 часа клетки окрашивали и оценивали их количество и состояние с помощью флуоресцентного микроскопа, совмещенного с цифровой фотокамерой. На рис. 3 представлены репрезентативные флуоресцентные микрофотографии клеток MCF-7 и HaCaT спустя 24 часа после воздействия раствора препарата 1 в дозе 25 мкг/мл и ДМСО (B,D) и равного объема только ДМСО (контроль) (A,C). При действии препарата на клетки MCF-7 выявлен более низкий показатель общего количества клеток, чем в контроле, при этом процент мертвых некротических клеток (красная флуоресценция) был весьма незначителен. Снижение числа клеток MCF-7 под действием препарата 1, очевидно, обусловлено подавлением их пролиферации и активацией апоптоза. Еще более выражено действие препарата 1 на клетки HaCaT. Спустя 24 ч после инкубации их число многократно снижается, а процент мертвых клеток, которые могут быть на стадии позднего апоптоза или некротическими (красная флуоресценция) достаточно высокий.

В результате проведенных исследований установлено, что эффективным цитотоксическим действием обладают метанольный экстракт (препарат 1) эндемичного растения Аджарского флористического района. На основании зависимости доза-эффект рассчитаны концентрации этого препарата в культуральной среде, при которых количество жизнеспособных клеток снижается спустя 24 часа на 50 % (ЦТД₅₀). Значения ЦТД₅₀ приведены в таблице 4.

Данные, приведенные в таблице 4, указывают, что препарат 1 не обладает специфической цитотоксичностью в отношении клеточной линии аденокарциномы молочной железы человека MCF-7, которая характерна, например, для растительного пигмента куркумина. Высокая специфическая цитотоксич-

ность препарата 1 в отношении кератиноцитов дает основание рассматривать экстракт эндемичного растения Аджарского флористического района Грузии как потенциальное фармакологическое средство для наружной терапии патологий, обусловленных повышенной пролиферацией кератиноцитов, например, псориаза.

ЛИТЕРАТУРА

1. Boukmap P., Petrussevska R.T., Breitreutz D., Hornung J., Markham A., Fusenig N.E. Normal keratinization in a spontaneously immortalized human keratinocyte cell line // Journal of cellular biology. - 1988. - №3: V. 106. - P. 761-771.
2. Breitreutz D., Schoop V.M., Mirancea N., Baur M., Stark H.J., Fusenig N.E. Epidermal differentiation and basement membrane formation by HaCaT cells in surface transplants // European Journal of Biology. - 1998. - V. 75. - P. 273-286.
3. Lacroix, M; Leclercq G. (2004). «Relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumours: an update» // Breast Research and Treatment. 83 (3): 249-289.
4. Lee H.P., Choi Y.J., Cho K.A., Woo S.Y., Yun S.T., Lee J.T., Kim H.J., Lee K.H., Kim J.W. Effect of Spa Spring Water on Cytokine Expression in Human Keratinocyte-HaCaT Cells and on Differentiation of CD4(+) T Cells. - 2012. - №3: V. 24. - P. 324-336.
5. Micallef L., Belaubre F., Pinon A., Jayat-Vignoles C., Delage C., Charveron M., Simon A. Effects of extracellular calcium on the growth-differentiation switch in immortalized keratinocyte HaCaT cells compared with normal human keratinocytes. // ExpDermatol. - 2009. - №2: V. 18. - P. 143-151.
6. Schoop V.M., Mirancea N., Fusenig N.E. Epidermal organization and differentiation of HaCaT keratinocytes in organotypic coculture with human dermal fibroblasts // Journal of investigative dermatology. - 1999. - V. 112. - P. 343-353.
7. Soule, HD; Vazquez J; Long A; Albert S; Brennan M. (1973). A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma // J. National Cancer Institute. 51 (5): 1409-1416.
8. Yang H.B., Song W., Chen L.Y., Li Q.F., Shi S.L., Kong H.Y., Chen P. Differential expression and regulation of prohibitin during curcumin-induced apoptosis of immortalized human epidermal HaCaT cells // Int J Mol Med. - 2014. - 3: V. 33. - P. 507-514.

SUMMARY

STUDY OF CYTOTOXIC ACTIVITY OF METHANOL EXTRACTS OF THE ENDEMIC PLANT OF THE GENUS ERYSIMUM OF THE ADJARIAN FLORISTIC DISTRICT OF GEORGIA

Beridze D., Metreveli M., Joxadze M., Bakuridze K., Berashvili D., Bakuridze A.

Tbilisi State Medical University, Georgia

According to the results, investigated methanolic extracts of endemic plant from Adjarian floristic region of Georgia do not have specific cytotoxicity against the cell lines of breast adenocarcinoma MCF-7 human, which is typical, e.g., for plant pigment curcumin. At the same time, the high specific cytotoxicity of 2 and 3 fractions towards keratinocytes gives reason for considering endemic plant extracts, of Adjarian floristic region of Georgia, as a potential pharmacological means for topical treatment of pathologies caused by increased proliferation of keratinocytes, such as psoriasis.

Keywords: methanolic extracts, breast adenocarcinoma, psoriasis.

РЕЗЮМЕ

ИССЛЕДОВАНИЕ ЦИТОТОКСИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ МЕТАНОЛЬНЫХ ЭКСТРАКТОВ ЭНДЕМИЧНЫХ ВИДОВ РАСТЕНИЙ РОДА ERYSIMUM АДЖАРСКОГО ФЛОРИСТИЧЕСКОГО РАЙОНА ГРУЗИИ

Беридзе Д.Н., Метревели М.В., Джохадзе М.С., Бакуридзе К.А., Берашвили Д.Т., Бакуридзе А.Д.

Тбилисский государственный медицинский университет, Грузия

В результате проведенных исследований установлено, что эффективным цитотоксическим действием обладает метанольный экстракт (препарат 1) эндемичного растения Аджарского флористического района.

Препарат 1 не обладает специфической цитотоксичностью в отношении клеточной линии аденокарциномы молочной железы человека MCF-7, которая характерна, например, для растительного пигмента куркумина. В тоже время, высокая специфическая цитотоксичность препарата 1 в отношении кератиноцитов дает основание рассматривать экстракт эндемичного растения Аджарского флористического района Грузии как потенциальное фармакологическое средство для наружной терапии патологий, обусловленных повышенной пролиферацией кератиноцитов, например, псориаза.

რეზიუმე

აჭარის ფლორისტული რეგიონის ენდემური სახეობის *Erysimum*-ის გვარის მცენარეების მეთანოლიანი ექსტრაქტების ციტოტოქსიკური აქტიურობის შესწავლა

დ. ბერიძე, მ. მეტრეველი, მ. ჯოხაძე, კ. ბაკურიძე, დ. ბერაშვილი, ა. ბაკურიძე

თბილისის სახელმწიფო სამედიცინო უნივერსიტეტი, საქართველო

აჭარის ფლორისტული რეგიონის ენდემური მცენარეების მეთანოლიანი ექსტრაქტების კვლევით ერთ პრეპარატს (პრეპარატი 1) აღმოაჩნდა გამოსატოვი ციტოტოქსიკური მოქმედება. ამასთან, მას არ ახასიათებს სპეციფიკური ციტოტოქსიკური მოქმედება MCF-7-ის, ადამიანის სარძევე ჯირკვლის ადენოკარცინომის უჯრედული კულტურის მიმართ, რაც დამახასიათებელია მცენარეული პიგმენტის კურკუმინისათვის. პრეპარატი 1-ს გააჩნია მაღალი სპეციფიკური ციტოტოქსიკური აქტიურობა კერატინოციტების მიმართ. შესაბამისად, აჭარის ფლორისტული რეგიონის ენდემური მცენარის მეთანოლიანი ექსტრაქტი შეიძლება გამოყენებული იყოს, როგორც პოტენციური ფარმაკოლოგიური საშუალება კერატინოციტების მაღალი პროლიფერაციით განპირობებული პათოლოგიების, მაგალითად, ფსორიაზის გარეგანი თერაპიისათვის.

CORRELATION BETWEEN SPIROMETRY DATES AND SPECIAL ALLERGEN-SPECIFIC IgE IN PATIENTS WITH BRONCHIAL ASTHMA IN WEST GEORGIA

Sepiashvili R., Chikhladze M., Khachapuridze D., Gamkrelidze S.

*National Institute of Allergology, Asthma and Clinical Immunology, Georgian Academy of Sciences, Tskaltubo, Georgia;
Peoples' Friendship University of Russia (RUDN University), Moscow, Russia*

Bronchial asthma is a serious global health problem. 5% to 10% of persons of all ages suffer from this chronic airway disorder. An atopic diathesis, a genetic predisposition toward the production of IgE antibodies in response to pollen, house dust mites, fungi, or animal-derived proteins, is the most important risk factor for bronchial asthma. Prevention of the disease, as well as effective diagnostic and treatment methods have great importance for managing this problem [1,4]. The modern approaches in the prevention and treatment of asthma are delivered by GINA „Global Strategy for Asthma Management and Prevention” [2,5]. The main recommendations of this initiative have already been using in different countries, includes Georgia, with consideration of national peculiarities. The clinical-epidemiological study revealed that the western Georgia is distinguished with diversity and frequency of allergic diseases, especially high rate of respiratory allergies caused by the acute factors of eco-geographical climate: air temperature, humidity and the variety of plants represented in the region .

According to the above-mentioned, at this stage, the study aimed to establish correlation between airway obstruction and specific IgE specificity, managing future treatment in the patients with bronchial asthma, among the population of west Georgia.

Material and methods. In the study have been involved 56 patients (among them 24 males and 32 females) of different ages, with diagnostic bronchial asthma (according to GINA recommendation), who applied to the S/R Institute of Allergology, Asthma and Clinical Immunology of Georgian Academy of Sciences for specific allegro-diagnostics and for management of treatment (Tskaltubo, Georgia).

On the ground of the aim the study included the following steps of allegro-diagnostics:

I step – Computerized spirometry by apparatus „SPIRO-LAB 3” was conducted for verification of external respiratory changes and estimation level of bronchial obstruction. Besides Peak expiratory flow (PEF), the following parameters were studied and analyzed: forced expiratory volume in 1 sec (FEV1), forced volume vital capacity (FVC), FEV1/FVC ratio (FEV1%) - Tiffeneau-Pinelli index.

II step – To detect allergenization degree, total serum IgE levels, specific IgE and concentration of Phadiatop, using modern automated system - “Immuno CAP 100” (PHADIA, Switzerland), were estimated in the patients.

III step- future treatment recommendations.

Results and their discussion. All 56 patients were undergone the spirometry measurement. Our results show that from 56 patient 21 (38%) had very severe obstruction by spirometry: Pretest: FEV1 – 28%; FEF-45%; FEV1/FVC ratio -55% on average. Post test: significant bronchodilatation was revealed FEV1> +12%(> 200mL) after the inhalation of four puffs of a short – acting beta2 sympathomimetic agent, e.r., 400 µg of salbutamol. In 19 (33%) patients severe bronchoobstruction was established. By spirometry was revealed: Pretest: FEV1 – 42%; FEF-55%; FEV1/FVC ratio -67% on average. Post test: significant bronchodilatation was revealed FEV1> +12%(>200 mL) after the inhalation of four puffs of a short – acting beta2 sympathomimetic agent, e.r., 400 µg of salbutamol. In 14 (25%) patients moderate bronchoobstruction was diagnosed, the spirometry results were : Pretest: FEV1 – 52%; FEF-65%; FEV1/FVC ratio -67% on average. Post test: It was revealed significant bronchodilatation FEV1> +12%(>200 mL). Only in 2 (4%) patients were diagnosed the normal spirometry.

All the patients were treated by GINA „Global Strategy for Asthma Management and Prevention” with consideration of national peculiarities. From 56 patients in 49 (88%) the asthma was controlled, and only in 7 (12%) patients disease was uncontrolled.

According to the analysis of the laboratory results obtained after using modern automated system - “ImmunoCAP 100” showed that all patients with bronchial asthma revealed high titers of total IgE, Phadiatop test was positive in 48 (85%) patient from 56 and only in 8 (15%) Phadiatop was negative. Identification of a particular allergen was carried out by investigation of allergen-specific IgE.

In the patients with bronchial asthma of a specific positivity of specific IgE to the weeds (Wx2) – ambrosia, plantain, clasp/ tarragon, atriplex –in 23 (53%) on average; tree dust (Tx9) - alder, lactarius piperatus, nuts, oak, willow - 11 (19%) ; and cereals (Gx1) - festuca pratensis, lolium temulentum, timoti grass, poa - 9 (16%); Mx2 -Penicillium potatum, Cladosporium herbarum, Aspergillus fumigatus, Candida albicans, Alternaria alternate- 15 (21%) was revealed , only in 5 (9%) patients we cannot established the allergy specific IgE.

It was established the correlation between spirometry dates and special allergen specific Ig E in patient with bronchial asthma.

According to the study results, among the etiologic factors of bronchial asthma the highest percentage comes on plant allergens-aeropollutants, which is proved by appropriate specific IgE positivity. The modern management of allergy is allergo-specific immunotherapy (ASIT), there are: Allergen-specific subcutaneous (SCIT) and Sublingual immunotherapy (SLIT), also called “desensitization,” has been shown to reduce medication use and bronchial hyper-reactivity, as compared with placebo, in mild to moderately severe asthma, although it does not improve pulmonary function values [3,6]. This statement applies mainly to younger patients. ASIT has a markedly lower chance of success in older patients who have had asthma for a long time, whose symptoms arise independently of allergen exposure, and for whom anti-inflammatory pharmacotherapy has been less effective. ACIT is contraindicated in patients whose pulmonary function is persistently impaired with FEV₁ values below 70%. Specific immunotherapy should be performed only by a physician with experience in allergology. It does not replace effective anti-asthmatic pharmacotherapy, but should rather be seen as a complementary element of asthma management. There is accumulating evidence that ACIT can help prevent the progression of allergic rhino-conjunctivitis to allergic asthma in children and adolescents.

The patients suffering from bronchial were supplied with the data of aeropolinometer “Burkard Trap”, developed by our clinic permanently updating calendar for distribution of aeroallergens in Imereti region, which reflects the concentration of blossoming plant-trees and atmospheric aeroallergens in the air at a given period of time.

Conclusion.

By spirometry is possible to estimate degree of bronchoobstruction and severity of disease in patient with diagnostic bronchial asthma.

Increased concentration of Immuno CAP/Phadiatop in blood indicates to the present of bronchial asthma to inhalative allergens.

“Immuno CAP 100” allowed us to specify/determine the presence of specific IgE to certain allergens in blood serum. It was established the correlation between spirometry dates and special allergen specific Ig E in patient with bronchial asthma.

The high level of specific IgE to aeroallergens was revealed in the patients with bronchial asthma, the specificity of which was particularly strengthened by correlation with other allergens specific for the given region. The latter is of great importance for providing the effective and safe allergo-specific immunotherapy (ASIT) and successful preventive measures.

REFERENCES

1. Arztliches Zentrum für Qualität in der Medizin. Nationale Versorgungs-Leitlinie Asthma bronchiale Dtsch Arztebl. 2005;102(40):A 2734–A 2734.
2. Bateman ED, Hurd SS, Barnes PJ, et al. Global strategy for asthma management and prevention: GINA executive summary. Eur Respir J. 2008;31:143–178.
3. Buhl R, Berdel D, Criece C-P, Gillissen A, Kardos P, Kroegel C, et al. Leitlinie zur Diagnostik und Therapie von Patienten mit Asthma. Pneumologie 2006;60:139–183.
4. Reddel HK, Salome CM, Peat JK, Woolcock AJ. Which index of peak expiratory flow is most useful in the management of stable asthma? Am J Respir Crit Care Med. 1995;15:1320–1325.
5. Nelson HS. Is there a problem with inhaled long-acting b-adrenergic agonists? J Allergy Clin Immunol. 2006;117:3–16.
6. Bousquet J, Lockey R, Malling HJ. Allergen immunotherapy: therapeutic vaccines for allergic diseases. A WHO position paper. J Allergy Clin Immunol. 1998;102:558–562.

SUMMARY

CORRELATION BETWEEN SPIROMETRY DATES AND SPECIAL ALLERGEN-SPECIFIC IgE IN PATIENTS WITH BRONCHIAL ASTHMA IN WEST GEORGIA

Sepiashvili R., Chikhladze M., Khachapuridze D., Gamkrelidze S.

National Institute of Allergology, Asthma and Clinical Immunology, Georgian Academy of Sciences, Tskaltubo, Georgia; Peoples' Friendship University of Russia (RUDN University), Moscow, Russia

The study aimed to establish correlation between airway obstruction and specific IgE specificity, managing future treatment in the patients with bronchial asthma, among the population of west Georgia. In the study have been involved 56 patients (among them 24 males and 32 females) of different ages, with diagnostic bronchial asthma (according to GINA recommendation). On the ground of the aim the study included the following steps of allegro-diagnostics: I step – Computerized spirometry by apparatus „SPIROLAB 3”. II step – To detect allergenization degree, total serum IgE levels, specific IgE and concentration of Phadiatop, using modern automated system - "Immuno CAP 100", were estimated in the patients. III step-future treatment recommendations. All 56 patients were undergone the spirometry measurement. Our results show that of 56 patient 21 (38%) had very severe obstruction by spirometry: Pretest: FEV₁ – 28%; FEF_{45%}; FEV₁/FVC ratio -55% on average. Post test: significant bronchodi-

lation was revealed FEV1 > +12% (>200 mL) after the inhalation of four puffs of a short-acting beta2 sympathomimetic agent, e.r., 400 µg of salbutamol. In 19 (33%) patients severe bronchoobstruction was established. By spirometry was revealed: Pre test: FEV1 - 42%; FEF-55%; FEV1/FVC ratio -67% on average. Post test: significant bronchodilatation was revealed FEV1 > +12% (>200 mL) In 14 (25%) patients moderate bronchoobstruction was diagnosed, the spirometry results were. Pretest: FEV1 - 52%; FEF-65%; FEV1/FVC ratio - 67% on average. Post test: It was revealed significant bronchodilatation FEV1 > +12% (>200 mL). Only in 2 (4%) patients were diagnosed the normal spirometry. In the patients with bronchial asthma of a specific positivity of specific IgE to the weeds (Wx2) - ambrosia, plantain, clasp/tarragon, atriplex - in 23 (53%) on average; tree dust (Tx9) - alder, lactarius piperatus, nuts, oak, willow - 11 (19%); and cereals (Gx1) - festuca pratensis, lolium temulentum, timoti grass, poa - 9 (16%); Mx2 -Penicillium notatum, Cladosporium herbarum, Aspergillus fumigatus, Candida albicans, Alternaria alternate- 15 (21%) was revealed, only in 5 (9%) patients we cannot established the allergy specific IgE.

It was established the correlation between spirometry dates and special allergen specific IgE in patient with bronchial asthma. The latter is of great importance for providing the effective and safe allegro-specific immunotherapy (ASIT) and successful preventive measures.

Keywords: bronchial asthma, spirometry, special allergen-specific IgE, ASIT.

РЕЗЮМЕ

КОРРЕЛЯЦИЯ МЕЖДУ СПИРОМЕТРИЧЕСКИМИ ПОКАЗАТЕЛЯМИ И СПЕЦИФИЧНОСТЬЮ АЛЛЕРГЕНСПЕЦИФИЧЕСКИХ IgE У ПАЦИЕНТОВ С БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ

Сепиашвили Р.И., Чихладзе М.В., Хачапуридзе Д.Р., Гамкрелидзе С.Л.

НИИ аллергологии, астмы и клинической иммунологии Академии наук Грузии, Цхалтубо, Грузия; Российский университет дружбы народов, Москва, Россия

Целью исследования явилось определение корреляции между данными спирометрии и специальными, аллергоспецифичными IgE среди населения Западной Грузии с целью эффективного лечения пациентов с диагнозом бронхиальной астмы.

Исследовано 56 пациентов различного возраста, из них мальчиков - 24, девочек - 32 с диагнозом бронхиальной астмы, которые обратились в Институт аллергологии, астмы и клинической иммунологии Академии наук Грузии (Цхалтубо, Грузия) для аллергодиагностики.

Исследование включало следующие этапы: I этап - компьютерная спирометрия Spirolab III; II этап - определение специфического IgE в сыворотке крови с помощью автоматизированной системы «Immuno CAP 100» (PHADIA, Швейцария); III этап - планирование эффективного лечения- аллерген-специфическая иммунотерапия.

В результате проведенного исследования выявлена корреляция между данными спирометрии и специальными, аллергоспецифичными IgE у больных бронхиальной астмой, что весьма значимо для проведения целенаправленного лечения, эффективной и безопасной иммунотерапии и успешной реализации профилактических мер.

რეზიუმე

კორელაცია სპირომეტრიულ მაჩვენებლებსა და ალერგენსპეციფიკურ IgE-ს სპეციფიურობას შორის ბრონქული ასთმის მქონე პაციენტებში

რ. სეფიაშვილი, მ. ჩიხლაძე, დ. ხაჭაპურიძე, ს. გამკრელიძე

ალერგოლოგიის, ასთმისა და კლინიკური იმუნოლოგიის ს/კ ინსტიტუტი. წყალტუბო, საქართველო; ხალხთა მეგობრობის უნივერსიტეტი, მოსკოვი, რუსეთი

კვლევის მიზანს წარმოადგენდა კორელაციის დადგენა ბრონქობსტრუქციის სპეციფიურ IgE-ს სპეციფიურობას შორის დასავლეთ საქართველოს მოსახლეობაში.

კვლევაში ჩართული იყო სხვადასხვა ასაკის 56 პაციენტი (24 მამაკაცი, 32 ქალი) ბრონქული ასთმის დიაგნოზით, რომლებმაც ალერგოლოგიის ინსტიტუტისა და ევექტური მეურნალობის მიზნით მიმართეს საქართველოს მეცნიერებათა აკადემიის ალერგოლოგიის, ასთმის და კლინიკური იმუნოლოგიის სამეცნიერო-კვლევით ინსტიტუტს (წყალტუბო, საქართველო). კვლევა მოიცავდა შემდეგ ეტაპებს: I - ბრონქობსტრუქციის დიაგნოსტიკა კომპიუტერული სპირომეტრიით (Spirolab III); II - სისხლის შრატში სპეციფიკური IgE-ს დადგენა ავტომატიზებული სისტემით ("Immuno CAP 100", PHADIA, შვეიცარია), III - ევექტური მეურნალობის ტაქტიკის შემუშავება - ალერგოსპეციფიკური იმუნოთერაპია.

დადგენილია კორელაცია ბრონქობსტრუქციის სხვადასხვა ხარისხსა და ალერგენსპეციფიკური IgE-ს სპეციფიურობას შორის, რაც მნიშვნელოვანია მიზანმიმართული მეურნალობის, ევექტური და უსაფრთხო იმუნოთერაპიის და პრევენციული ღონისძიებების წარმატებით განხორციელებისათვის.

ОЦЕНКА ПАРАМЕТРОВ ВНЕШНЕГО ДЫХАНИЯ СТУДЕНТОВ

Валишвили Т.Н., Чихладзе М.В., ГамкRELИДзе С.Л.

Национальная академия наук Грузии, Национальный институт аллергологии, астмы и клинической иммунологии, Цхалтубо; Государственный университет им. Акаки Церетели, Кутаиси, Грузия

Тесная связь дыхательной системы с другими системами и органами, ее значительное участие в процессах обмена веществ еще раз доказывает исключительную роль изучения функции внешнего дыхания. Методы исследования параметров внешнего дыхания определяют возможность оценить анатомо-физиологические особенности структурных единиц легких, а также адекватность отдельных процессов, которые обеспечивают газообмен между атмосферным воздухом и легочными капиллярами. Основным методом функционального исследования легких является спирометрия, которая позволяет фиксировать изменения легочного объема в процессе различных режимов дыхания, а также регистрировать скорости движения воздуха в условиях изменяющегося объема легких [2-4,6,8].

Охрана здоровья студентов является одной из значимых социальных задач современного общества. Эффективная подготовка высококвалифицированных кадров тесно связана с охраной здоровья молодого поколения, повышением работоспособности студентов. В современных условиях социальной, политической, экономической лабильности данная прослойка населения испытывает значительное отрицательное влияние факторов окружающей среды, что связано с высокими физическими, эмоциональными и умственными нагрузками, связанными с периодом адаптации к новым условиям студенческой жизни. Доказано, что студенты первых трех лет обучения имеют более высокие показатели заболеваемости, распространения негативных тенденций в образе жизни, недостаточный уровень гигиенического воспитания. Эти факторы приводят к снижению адаптации молодежи, в связи с чем проявляются серьезные социально-психологические и медицинские проблемы, возникающие в той или иной форме [1,5,7].

Проведен литературный обзор с целью изучения подобных исследований, хотя в точности публикации подобных исследований не выявлены. Результаты, полученные в ходе проведенного исследования помогут сформулировать профилактические рекомендации для улучшения параметров внешнего дыхания, исходя из национальных и возрастных особенностей исследуемой группы.

В связи с вышеуказанными фактами является актуальным исследование и уточнение физиологических показателей функции внешнего дыхания студентов с целью превенции развития психосоматических расстройств и повышения качества процесса обучения.

Целью исследования явилось проведение спирографических исследований с целью уточнения региональной нормы основных физиологических показателей функции внешнего дыхания представителей молодой возрастной группы (18-21 лет) популяции Грузии.

Материал и методы. Принципом случайной выборки в осенне-зимний период обследованы 235 практически здоровых студентов в возрасте от 18 до 21 года, девушки - 103, юноши - 132. Исследование функции внешнего дыхания проводили методом компьютерной спирометрии с применением аппарата Spirolab 3 и методом пульсоксиметрии. Спирометрические исследования проводились на базе Национального научно-исследовательского института клинической иммунологии, аллергии и астмы Академии наук Грузии (Цхалтубо), в утренние часы при информированном согласии студентов. Программное обеспечение позволяет конвертировать объемные и скоростные показатели в систему ВTPS и сравнивать их с должными величинами.

Методом пульсоксиметрии определяли степень насыщения гемоглобина кислородом, %.

Методом спирометрии оценивали следующие параметры: жизненная емкость легких (ЖЕЛ), форсированная жизненная емкость легких (ФЖЕЛ), объем форсированного выдоха за первую секунду (ФЖЕЛ1), объем форсированного выдоха за 1 сек/жизненная емкость легких (индекс Тиффно), пиковая (максимальная) объемная скорость форсированного выдоха (ПОС); максимальная скорость выдоха на уровне выдоха 25% форсированной жизненной емкости легких (МОС25%); максимальная скорость выдоха на уровне выдоха 50% форсированная жизненная емкость легких (МОС50%), максимальная скорость выдоха на уровне выдоха 75% ФЖЕЛ (МОС75%), средняя объемная скорость в интервале между 25% и 75% ФЖЕЛ (МОС 25-75%), максимальная вентиляция легких (МВЛ), объем форсированного вдоха за первую секунду (ОФВ), резервный объем выдоха (РОВ), емкость вдоха (ЕВ). Выполнение маневров для определения жизненной емкости легких и форсированной жизненной емкости легких проводилось последовательно. В процессе одного исследования использовалось три повторных измерения. В процессе одного исследования использовалось три повторных измерения. Статистическую обработку результатов исследования проводили, вычисляя среднее арифметическое значение (М), ошибку сред-

него арифметического значения (m), и представляли в виде $M \pm m$. Различия между группами оценивали с помощью t -критерия Стьюдента, достоверными считались результаты при $p < 0,05$. Интерпретация показателей спирометрии проводилась между группами различного пола, а также по отношению к расчетным показателям нормы.

Следует отметить, что студенты, принимающие участие в исследовании, не имели никаких жалоб со стороны здоровья (особенно в отношении дыхательной системы). Исходя из данных анкеты-опросника, они не были часто подвержены инфекциям и другим заболеваниям верхних дыхательных путей, не имели жалоб со стороны дыхательной системы и не болели никакими заболеваниями в течение 2 недель до проведения исследования.

Результаты и их обсуждение. Компьютерная спирометрия проводилась согласно стандартам ERS, ATS. Результаты исследования функции внешнего дыхания у обследованных студентов представлены в таблице.

Границей нормальных значений ЖЕЛ, ФЖЕЛ, ФЖЕЛ1, индекс Тиффно, ПОС, МОС75%, МОС50%, МОС25%, МОС25-75% этих показателей считается 80% от должной величины. Как показывают исследования, все показатели находятся в пределах возрастной нормы.

Исследование ЖЕЛ данной возрастной группы выявило, что ее фактическая величина находится в пределах нормы у обоих полов, однако следует отметить, что показатели у лиц женского пола оказались несколько выше: ЖЕЛ девушек - $109.5 \pm 4.5\%$, ЖЕЛ юношей - 99 ± 5.25 , что, по всей вероятности, связано с меньшим процентным количеством курящих женщин-студенток в сравнении со студентами мужского пола и, в определенной степени, с внелегочными рестриктивными изменениями, обусловленными ограниченной подвижностью грудной клетки ввиду относительно слабого развития вспомогательных дыхательных мышц.

Исследование форсированной жизненной емкости легких выявило, что этот показатель соответствует

Таблица 1. Функциональные показатели внешнего дыхания у обследованных студентов ($n=235$)

Параметры спирометрии	Девушки ($n=103$)			юноши ($n=132$)		
	Predicted ($M \pm m$)	Pretest ($M \pm m$)	Pretest % ($M \pm m$)	Predicted ($M \pm m$)	Pretest ($M \pm m$)	Pretest % ($M \pm m$)
ЖЕЛ	3.66 ± 0.121	4.005 ± 0.045	109.5 ± 4.5	5.80 ± 0.417	5.501 ± 0.209	99 ± 5.25
ФЖЕЛ	3.64 ± 0.110	3.46 ± 0.110	95 ± 6.0	5.55 ± 0.394	5.363 ± 0.145	98 ± 10.20
ФЖЕЛ1	3.19 ± 0.070	3.33 ± 0.115	104 ± 3.60	4.59 ± 0.316	4.54 ± 0.056	100 ± 8.38
ПОС	7.02 ± 0.157	5.28 ± 0.111	74.5 ± 0.79	10.31 ± 0.447	9.28 ± 0.575	90 ± 2.16
ФЖЕЛ1/ЖЕЛ	84.4 ± 2.701	96.5 ± 6.550	114.5 ± 7.5	82.7 ± 1.221	85.7 ± 0.90	104 ± 1.41
ФЖЕЛ1/ФЖЕЛ	84.4 ± 2.701	83.2 ± 3.901	98.5 ± 1.41	82.7 ± 1.221	82.7 ± 1.221	99 ± 0.81
МОС75%	2.19 ± 0.025	1.845 ± 0.758	100 ± 8.5	2.225 ± 0.225	2.270 ± 0.020	87 ± 6.0
МОС50%	4.52 ± 0.062	3.925 ± 1.220	87.0 ± 5.0	5.870 ± 0.320	5.46 ± 0.085	$94,5 \pm 2.5$
МОС25%	6.21 ± 0.091	4.745 ± 0.135	76.5 ± 3.5	5.201 ± 0.396	4.69 ± 0.08	84 ± 7.0
МОС25-75%	4.1 ± 0.0301	3.445 ± 0.305	$84 \pm 7,0$	8.880 ± 0.460	9.35 ± 0.455	98 ± 7.0
Степень насыщения Hb 02, %			$98,65 \pm 1,0$			

возрастной норме, хотя ФЖЕЛ у лиц женского пола ($95 \pm 6.0\%$) несколько снижена в сравнении с лицами мужского пола ($98 \pm 10.20\%$), несмотря на то, что жизненная емкость легких остается в пределах нормы и даже выше - $109.5 \pm 4.5\%$. Известно, что более существенное снижение форсированной ЖЕЛ по сравнению с ЖЕЛ говорит о нарушениях бронхиальной проходимости. В данном случае можно судить только о риске и определенной тенденции к обструктивным поражениям легких, поскольку молодой возраст и пока еще высокие адаптивные свойства респираторной системы обеспечивают работу дыхательной системы на должном уровне.

Объем форсированного выдоха, показывающий тот объем, который обследуемый способен выдохнуть за первую секунду при максимально быстром и глубоком выдохе после предварительного максимального вдоха (ФЖЕЛ1), находится в пределах нормы.

Показатели ФЖЕЛ1/ЖЕЛ и ФЖЕЛ1/ФЖЕЛ также находятся в пределах возрастной нормы.

Пиковая (максимальная) объемная скорость форсированного выдоха – снижена у лиц женского пола в сравнении с юношами - $74.5 \pm 0.79\%$ - $90 \pm 2.16\%$, соответственно.

Что касается, показателей максимальной скорости выдоха на уровне выдоха различного процентного объема форсированной жизненной емкости легких, эти показатели варьируют, указывая на определенные тенденции функционального состояния и напряжение процессов адаптации респираторной системы. В частности, МОС25% - максимальная скорость выдоха на уровне выдоха 25% форсированной жизненной емкости легких, незначительно снижена в обеих половых категориях: у девушек-студенток она составляла - $76.5 \pm 3.5\%$, у студентов-юношей - $84 \pm 7.0\%$, что свидетельствует о снижении проходимости крупных бронхов. Данный показатель у девушек был ниже, чем у юношей.

МОС50% - максимальная скорость выдоха на уровне выдоха 50 % форсированной жизненной емкости легких и МОС75% - максимальная скорость выдоха на уровне выдоха 75% находятся в пределах нормы, что свидетельствует о нормальной проходимости средних и мелких бронхов, следует отметить, что наблюдается тенденция к снижению данных показателей, что еще раз подчеркивает необходимость укрепления адаптивных возможностей проведения профилактических мер по предупреждению обструктивных заболеваний дыхательной системы.

МОС25-75% - средняя скорость выдоха 25-75% форсированной жизненной емкости легких также свидетельствует о тенденции к ослаблению процессов адаптации

и о риске снижения проходимости бронхо-легочной системы.

Растущая урбанизация отражается на адаптивной перестройке аппарата внешнего дыхания молодой возрастной группы. Благоустроенность жизни, европейский тип питания, низкий двигательный режим уменьшают уровень физического развития студентов.

Таким образом, в процессе исследования были определены и уточнены физиологические показатели функции внешнего дыхания у молодого поколения популяции Грузии (возрастная группа 18-21 лет). Данные исследования показали актуальность и необходимость проведения исследований подобного типа во всех возрастных группах популяции. Знание национальных нормативов внешнего дыхания позволит определить риск развития заболеваний респираторной системы, провести эффективную профилактику, разработать рекомендации по лечению заболеваний дыхательной системы с учетом возрастных, половых, национальных особенностей. Полученные нами значения объемно-временных показателей внешнего дыхания, могут служить уточненной регионарной нормой для молодого поколения Грузии.

Полученные нами значения объемно-временных показателей внешнего дыхания, могут служить уточненной регионарной нормой для молодого поколения Грузии.

ЛИТЕРАТУРА

1. American Academy of Allergy, Asthma, and Immunology, "Five Things Physicians and Patients Should Question", Choosing Wisely: an initiative of the ABIM Foundation (American Academy of Allergy, Asthma, and Immunology). Retrieved 14 2012; 8.
2. Chernesky C.C., Berger B.J. Laboratory Tests and Diagnostic Procedures, 6th ed. St. Louis: Saunders: 2013.
3. Ciprandi G., Cirillo I. Forced expiratory flow between 25% and 75% of vital capacity may be a marker of bronchial impairment in allergic rhinitis Journal of Allergy and Clinical Immunology 2011; 127(2): 549–549.
4. Kreider M. Chapter 14.1 Pulmonary Function Testing. ACP Medicine. Decker Intellectual Properties. Retrieved 29; 2011; 4.
5. National Health and Medical Research Council. Australian Guidelines for the Prevention and Control of Infection in Healthcare. National Health and Medical Research Council; 2011. Available from: <http://www.nhmrc.gov.au/node/30290>.
6. Shiner R.J., Steier J. Lung Function Tests Made Easy. 2012. Available from: <http://www.health.qld.gov.au/consent/default.asp>.
7. Quanjer P. Become an Expert in Spirometry. [cited 2012 14/12/2012]; Available from: <http://www.spirxpert.com/indices7.htm>

SUMMARY

ESTIMATION OF PARAMETERS OF EXTERNAL RESPIRATION OF STUDENTS

Valishvili T., Chikhladze M., Gamkrelidze S.

Georgian National Academy of Sciences, Scientific-Research Institute of Allergology, Asthma and Clinical Immunology, Tskhaltubo; Akaki Tsereteli State University, Kutaisi, Georgia

The close relationship of the respiratory system with other systems and organs, its significant participation in the processes of metabolism once again proves the exceptional role of the study of respiratory function. On the other hand, the health of students is one of the most important social tasks of modern society.

The aim of the study was detection of parameters of external respiration in students of Georgia.

235 students 18 to 21 of ages, were involved in the study, who underwent computer spirometry with Spiro lab 3 to achieve the aim of study. The research among Georgian students has shown the external respiration function with the following characteristics: Pretest (females n=103) -

VC=109.5±4.5%; FVC=99±5.25%; FEV1=104±3.60%; FEV1/VC=114.5±7.5%; PEF=74.5±0.79%; MEF 25%-75%=84±7,0%. Males (n=132) VC=99±5.25%; FVC=98±10.20%; FEV1=100±8.38%; FEV1/VC=104±1.41%; PEF=90±2.16; MEF 25%-75%=98±7.0%. Therefore, based on the research of Georgian students on computer spirometry external respiration function revealed the peculiarities of physiological parameters according to gender. The study, showed the need for the similar study among the variety of population in all age categories. It is really an actual issue for modern clinical medicine.

Keywords: spirometry, external respiration function, students.

РЕЗЮМЕ

ОЦЕНКА ПАРАМЕТРОВ ВНЕШНЕГО ДЫХАНИЯ СТУДЕНТОВ

Валишвили Т.Н., Чихладзе М.В., Гамкrelидзе С.Л.

Национальная академия наук Грузии, Национальный институт аллергологии, астмы и клинической иммунологии, Цкалтубо; Государственный университет им. Акаки Церетели, Кутаиси, Грузия

Тесная связь дыхательной системы с другими системами и органами, ее значительное участие в процессах обмена веществ еще раз доказывает исключительную роль изучения функции внешнего дыхания. С другой стороны, охрана здоровья студентов является одной из наиважнейших социальных задач современного общества.

Целью исследования явилось проведение спирометрических исследований с целью уточнения региональной нормы основных физиологических показателей функции внешнего дыхания представителей молодой возрастной группы (18-21 лет). Принципом случайной выборки обследованы 235 практически здоровых студентов обоих полов (103 девушки, 132 юноши) в возрасте от 18 до 21 года. Исследование функции внешнего дыхания проведено методом компьютерной спирометрии с применением аппарата Spirolab 3. Следует отметить, что молодые люди, принимающие участие в исследовании не имели никаких жалоб со стороны здоровья (особенно в отношении дыхательной системы). Компьютерная спирометрия проводилась согласно стандартам ERS,

ATS. Исследование данной возрастной группы выявило: Pretest (девушки n=103) - жизненная емкость легких -109.5±4.5%; форсированная жизненная емкость легких - 99±5.25%; объем форсированного выдоха за первую секунду - 104±3.60%; объем форсированного выдоха за 1 с/жизненная емкость легких - 114.5±7.5%; пиковая (максимальная) объемная скорость форсированного выдоха - 74.5±0.79%; средняя скорость выдоха 25% -75% форсированной жизненной емкости легких - 84±7,0%. Юноши (n=132): жизненная емкость легких - 99±5.25%; форсированная жизненная емкость легких - 98±10.20%; объем форсированного выдоха за первую секунду - 100±8.38%; бъем форсированного выдоха за 1 с/жизненная емкость легких - 104±1.41%; пиковая (максимальная) объемная скорость форсированного выдоха - 90±2.16; средняя скорость выдоха 25% -75% форсированной жизненной емкости легких - 98±7.0%. Данные исследования показали актуальность и необходимость проведения исследований подобного типа во всех возрастных группах популяции, так как установление национальных нормативов внешнего дыхания позволит определить риск развития заболеваний респираторной системы

с целью проведения эффективной профилактики и разработать рекомендации по лечению заболеваний дыхательной системы с учетом возрастных, половых, национальных особенностей. Полученные нами значения объемно-временных показателей внешнего дыхания, могут служить уточненной регионарной нормой для молодого поколения Грузии

რეზიუმე

გარეგანი სუნთქვის პარამეტრების შეფასება სტუდენტებში

თ. ვალიშვილი, მ. ჩიხლაძე, ს. გამყრელიძე

საქართველოს მეცნიერებათა ეროვნული აკადემია, ალერგოლოგიის, ასთმის და კლინიკური იმუნოლოგიის სამეცნიერო-კვლევითი ინსტიტუტი, წყალტუბო; აკაკი წერეთლის სახ. სახელმწიფო უნივერსიტეტი, ქუთაისი, საქართველო

სასუნთქი სისტემის მჭიდრო კავშირი ორგანიზმის სხვა სისტემებთან და ორგანოებთან, მისი მნიშვნელოვანი მონაწილეობა ნივთიერებათა ცვლის პროცესებში კიდევ ერთხელ ადასტურებს გარეგანი სუნთქვის კვლევის აუცილებლობას. მეორეს

მხრივ სტუდენტების ჯანმრთელობის დაცვა წარმოადგენს თანამედროვე საზოგადოების ერთ ერთ აქტუალურ პრობლემას.

ზემოაღნიშნულიდან გამომდინარე კვლევის მიზანს წარმოადგენდა გარეგანი სუნთქვის ფუნქციის ფიზიოლოგიური მახვენებლების დადგენა ქართველ სტუდენტებში.

კვლევაში მონაწილეობდა 18 დან 21 წლამდე ასაკის 235 (103 ქალი; 132 ვაჟი) პრაქტიკულად ჯანმრთელი სტუდენტი, რომელთაც ჩატარდა კომპიუტერული სპირომეტრია Spirolab 3-ის გამოყენებით. კომპიუტერული სპირომეტრია ჩატარდა ERS, ATS მიერ დადგენილი ყველა სტანდარტის გათვალისწინებით.

ამდენად, კომპიუტერული სპირომეტრით კვლევის შედეგად ქართველ სტუდენტებში გამოვლინდა გარეგანი სუნთქვის ფუნქციის ფიზიოლოგიური მახვენებლების თავისებურება სქესის მიხედვით. კვლევამ, ცხადყო მსგავსი კვლევის ჩატარების აუცილებლობა სხვადასხვა პოპულაციის ყველა ასაკობრივ ჯგუფში, რისკის ჯგუფების დადგენის და დროული პროფილაქტიკური ღონისძიებების განხორციელების მიზნით.

АМБРОЗИЙНАЯ АЛЛЕРГИЯ НА ЮГЕ РОССИИ - В ЧЕЧЕНСКОЙ РЕСПУБЛИКЕ

¹Мачарадзе Д.Ш., ²Янаева Х.А., ^{3,4}Авилов К.К.

¹Российский университет дружбы народов (РУДН), Москва; ²Медицинский центр «Планета здоровья», Урус-Мартан, Чеченская Республика; ³Институт вычислительной математики РАН, Москва; ⁴ЦНИИ Организации и информатизации здравоохранения МЗ РФ, Москва, Россия

В последнее время особое внимание уделяется изучению распространенности сенсибилизации к амброзии (Амб), что обусловлено стремительным распространением этого сорняка по всему миру и его значительной аллергенности [3,10,11,14,17,21-23]. К растениям рода амброзии принадлежит около 50 видов, из них 2 вида являются наиболее широко распространенными: *Ambrosia artemisiifolia* (амброзия полыннолистная) и гигантская амброзия (*A. trifida*). Для каждого региона доминируют разные виды Амб: в США, Канаде и некоторых странах Европы - *A. artemisiifolia* и западная амброзия; в Южном Техасе США – *A. trifida* и ложная амброзия (*A. acanthicarpa*); (*A. psilotachya*) [21].

A. artemisiifolia впервые зафиксирована в южной части России в 1918 году, а с конца 1930-х годов широко распространилась на Северном Кавказе - в Краснодарском и Ставропольском краях, а затем - в Ростовской области [3,22]. Из юга России и Украины пыльца Амб с западными и юго-западными ветрами попадает в среднюю полосу страны (<http://herba.msu.ru>). С недавних пор в Московском регионе и самой Москве также отмечено цветение Амб и даже повышение концентрации ее пыльцы в конце августа от 8 до 15 пылевых зёрен в кубометре (как правило, аллергические симптомы появляются при концентрации четырех пылевых зерен) [3]. *A. artemisiifolia* широко распространена в приграничных с Россией регионах

- в Грузии и Украине [16,22]. *A. trifida* занесена из Северной Америки и впервые на территории СССР собрана в г. Сухуми в 1924 г., а к 1974 г. обнаружена в Хабаровском крае [22].

По прогнозам экологов в будущем инвазия Амб существенно изменит экосистему во всем мире [16,24,25]. Неблагоприятное воздействие на пыльцу Амб оказывают изменения климата (повышение CO₂), что приводит к усилению ее аллергенности, влияет на распространение пыльцевых частиц и удлиняет сезон цветения [16,25].

Другой представитель семейства Сложноцветных – полынь (Пол), наиболее распространенный вид которого – *Artemisia vulgaris* [14,20,21,24,25]. Это растение, как и Амб, производит множество мелких пыльцевых зерен, которые воздухом легко переносятся на несколько сотен или даже тысяч километров, вызывая поллиноз во многих частях мира. Род полынь включает 57 видов в Европе и 187 видов в Китае [3].

Поскольку цветение Амб и Пол происходит одновременно, это затрудняет установление истинного первичного аллергена и ввиду сильной перекрестной реактивности создает сложную проблему в выборе аллерген-специфической иммунотерапии (АСИТ) [19,20]. Так, с позиций молекулярной алергодиагностики, сенсибилизированные к Амб и Пол пациенты могут иметь первичную сенсибилизацию (в том числе к пыльце каждого по отдельности сорняка) или, с другой стороны, положительный результат кожных проб или уровней специфических IgE к Амб и Пол может быть результатом перекрестной реактивности между ними [21,19,20]. При естественной сезонной аллергии на аллергенность самой пыльцы влияют также пыль и спора плесневых грибов, что негативно отражается на оценке данных алергообследования и новых методов АСИТ [21,20,25].

Аллергия на пыльцу сорных трав – одна из основных причин респираторной аллергии - сезонного аллергического риноконъюнктивита (сАРК, синоним «поллиноз») с/без бронхиальной астмы (БА) и даже обострения атопического дерматита в летне-осенние месяцы для многих пациентов Европы, США и, особенно, Южного региона России [1,2,4,5,10,11,19-22]. Еще с 70-х годов прошлого века эту проблему углубленно изучали ученые и экологи Краснодарского края. Почти 80% от общей площади зараженных Амб в России приходится на Краснодарский край [4,17,23]. Параллельно с обильным расселением Амб увеличивается доля пациентов, страдающих аллергией: за период с 1991 по 2015 гг. количество больных с поллинозом в Краснодарском крае возросло в 2,5 раза [4].

Эпидемиологические исследования, касающиеся рас-

пространенности аллергии на Амб и Пол у пациентов, проживающих в Чеченской республике, отсутствуют.

Целью данного ретроспективного исследования явилось изучение распространенности сенсибилизации к сорным травам у пациентов, проживающих в Чеченской Республике.

Материал и методы. Обследовано 845 пациентов в ходе посещения Медицинского центра г. Урус-Мартана за период 2013-2016 гг. Диагноз аллергических заболеваний ставил алерголог-иммунолог на основании данных анамнеза (наличие симптомов БА, сАРК), согласно критериям диагностики международных согласительных документов (GINA, 2016; GA²LEN, ARIA) и кожных проб (диаметр волдыря >3 мм на 1 и более аллерген). Кожные пробы включали 13 коммерческих ингаляционных аллергенов (производство ФГУП НПО «Микроген», Ставрополь, Россия), в том числе: смесь пыльцы деревьев, смесь луговых трав, амброзия, полынь, шерсть кошки, шерсть собаки, перхоть лошади, таракан, *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae*, а также грибковые аллергены (*Alternaria*, *Aspergillus fumigatus*, *Cladosporium herbarum* производства Allergopharma, Германия). Результаты кожных проб оценивали следующим образом: слабopоложительная реакция (1+) – максимальный диаметр волдыря 3-5 мм; положительная реакция (2+) – волдырь диаметром 5-10 мм; резко положительная реакция (3+) – волдырь диаметром 10-15 мм; очень резко положительная реакция (4+) – волдырь диаметром более 15 мм, с псевдоподиями.

Полисенсибилизацию определяли как наличие положительных результатов кожных проб на 2 и более экстрактов разных групп аллергенов. Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Статистический анализ проведен с использованием IBM SPSS. Распространенность аллергического заболевания выражали в процентах и 95% доверительным интервалом (ДИ). При оценке ДИ частот бинарных признаков (в частности, сенсибилизации) использовали метод Клоппера-Пирсона для биномиального распределения, а для анализа взаимосвязи двух бинарных признаков - точный метод Фишера.

Результаты и их обсуждение. Обследовано 845 пациентов в возрасте 4-68 лет (средний возраст 29,1 лет), в том числе 350 мужчин (41,4%). Большинство пациентов обратилось с жалобами на сАРК без БА (n=512), крайне редко отмечалось сочетание поллиноза с БА (n=26), что в сумме составило 63,7% (ДИ 60,3%-66,9%) от общего числа включенных в исследование пациентов. Результаты кожных проб на экстракты пыльцевых аллергенов показали, что наиболее часто пациенты были

Таблица 1. Показатели сенсибилизации к пыльцевым аллергенам по данным кожных проб у пациентов с респираторной аллергией, проживающих в Чеченской Республике

	Количество пациентов (n)	Выборочная частота (%)	95% ДИ (%)
Поллиноз без БА	512	60,59	57,21 – 63,90
Поллиноз с БА	26	3,08	2,02 – 4,48
Сенсибилизация к пыльцевым аллергенам:			
- деревьев	126	14,91	12,58 – 17,49
- луговых трав	432	51,12	47,70 – 54,54
- Амб	225	26,63	23,67 – 29,74
- Пол	175	20,71	18,02 – 23,60

Таблица 2. Данные кожных проб у обследованных пациентов с сенсибилизацией к пыльце амброзии и полыни

Пыльца	Результаты кожных проб (от + до 4+)	Количество пациентов (n)	Выборочная частота (%)	95% ДИ
Амб	0	620	73,37	70,26-76,33
	1+	2	0,24	0,03-0,85
	2+	23	2,72	1,73-4,06
	3+	72	8,52	6,73-10,61
	4+	128	15,15	12,80-17,75
	Всего 1+...4+	225	26,6	23,7-29,7
Пол	0	670	79,29	76,40-81,98
	1+	2	0,24	0,03-0,85
	2+	16	1,89	1,09-3,06
	3+	45	5,33	3,91-7,06
	4+	112	13,25	11,04-15,73
	Всего 1+...4+	175	20,7	18,0-23,6

Таблица 3. Количество пациентов с различными сочетаниями сенсибилизации к Амброзии и Полыни по результатам кожных проб (среди всех пациентов, n=845)

	Пол -	Пол+
Амбр -	594	26
Амбр +	76	149

сенсибилизированы к пыльце злаковых трав (51,12%), и меньше – к пыльце сорняков или деревьев (таблица 1).

Распределение пациентов, сенсибилизированных к пыльце Амб и Пол по данным кожных проб, показано в таблице 2. Таким образом, распространенность сенсибилизации к пыльце Амб и Пол у пациентов Чечни составила 26,6% и 20,7%, соответственно.

Совпадение сезона пыления этих двух разных видов растений семейства Сложноцветных сильно влияет на частоту одновременной сенсибилизации к ним по данным кожных проб: в частности, среди сенсибилизированных к Амб пациентов 66,2% имели ко-сенсибилизацию к пыльце Пол, а среди сенсибилизированных к Пол положительную кожную реактивность на Амб одновременно продемонстрировали 85,1%, $p_{\text{Фишер}} = 1,98 \cdot 10^{-79}$ и ДИ на отношении

шансов [27,7; 72,4], что свидетельствует о существовании очень сильной статистической взаимосвязи между сенсибилизациями к Амб и Пол (таблица 3). Суммарная распространенность сенсибилизации к сорным травам (Амб и Пол) составила 29,7% (95% ДИ 26,6% - 32,9%).

Другой задачей проведенного исследования явилось уточнение распространенности моно- и полисенсибилизации среди пациентов с поллинозом. Из общего числа таких пациентов (n=538) моносенсибилизированных было меньше (39,4%, ДИ 35,3%-43,7%, n=212), чем полисенсибилизированных (58,6%, ДИ 54,3%-62,7%, n=315). Интересно отметить, что моносенсибилизация только к пыльце Амб или Пол обнаруживалась крайне редко (в 2,7% и 2,9% случаев, соответственно), т.е. ~97% таких пациентов имели полисенсибилизацию (таблица 4).

Таблица 4. Распространенность моно- и полисенсibilизации к пыльцевым аллергенам среди всех обследованных пациентов (n=845) в Чеченской Республике

Сенсibilизация	Моносенсibilизация			Полисенсibilизация		
	n	%	95% ДИ	n	%	95% ДИ
Из всех пациентов (n =845)	344	40,7	37,4% - 4,1%	470	55,6	52,2% - 59,0%
При поллинозе (n=538)	212	39,4	35,3%-43,7%	315	58,6	54,3%-62,7%
- Смесь пыльцы деревьев (n=126)	21	16,7	10,6%-24,3%	105	83,3	75,7%-89,4%
- Смесь пыльцы злаковых трав (n=432)	154	35,6	31,1%-40,4%	278	64,4	59,6%-68,9%
- Амб (n=225)	6	2,7	1,0%-5,7%	219	97,3	94,3%-99,0%
- Пол (n=175)	5	2,9	0,9%-6,5%	170	97,1	93,5%-99,1%

Таким образом, полисенсibilизация достоверно чаще встречалась у больных, сенсibilизированных к Амб, чем среди несенсibilизированных к ней ($p_{\text{Фишер}}=1,09 \cdot 10^{-59}$).

Аллергические заболевания дыхательных путей, включая поллиноз и БА, являются основной проблемой для здравоохранения Европы, где около 30% населения страдает ими [10,11]. Среди причин респираторной аллергии важным триггером остается пыльца растений. Интенсивность аллергической реакции на них зависит от трех взаимосвязанных факторов: сколько пыльцы данного вида растения попадает в воздух; длительность воздействия (экспозиции) аллергенов и аллергенности самой пыльцы. Уникальность амброзии - в высокой производительности пыльцы, что составляет примерно миллиард зерен с одного растения [25].

В нашем исследовании все пациенты обращались с жалобами на респираторную аллергию и клиническими симптомами в соответствующий сезон цветения растений, что отражает реальную картину заболеваемости поллинозом (в том числе в сочетании с БА) в Чеченской Республике. Исследования, проведенные в регионах, непосредственно граничащих с Чечней (на западе Чечня граничит с Республикой Ингушетия, на северо-западе - с Республикой Северная Осетия-Алания, на севере - со Ставропольским краем, на северо-востоке и востоке - с Дагестаном, на юге - с Республикой Грузия), сильно отличаются по дизайну [1,2,4,5,23]. Кроме того, на эпидемиологические показатели существенное влияние оказывает ряд других факторов (экологические, климатогеографические), а также возраст исследуемой популяции; когорты пациентов. Тем не менее, как показывает краткий анализ публикаций, в Ставропольском крае у подростков преобладала сенсibilизация к пыльце злаковых (31%) и сорных (44%) трав, причем пыльцевая БА развивалась преимущественно (65,7% больных) одновременно с симптомами сезонного ринита [5]; в Республике Дагестан пыльцевая аллергия к злаковым и сорным травам превалировала у детей, проживающих в низменной зоне [1]; в Республике Се-

верная Осетия – Алания основной причиной поллиноза у пациентов старше 18 лет также была пыльца сорных (61,4%) и луговых (20,9%) трав [2]; хотя Имеретинский регион Грузии непосредственно не граничит с Чечней, 68% больных с респираторной аллергией имели сенсibilизацию к пыльце сорных растений, в 28% случаев - к злакам и в 30% - на пыльцу деревьев [23]. Тем самым, по данным Сепиашвили Р.И. и соавт. [23], с учетом аналогичных возрастных категорий исследуемых пациентов (от 4 до 68 лет), распространенность сенсibilизации к сорным травам и деревьям в Республике Грузия примерно в 2 раза выше по сравнению с полученными нами результатами, тогда как к злаковым травам в Чечне, напротив, было сенсibilизировано вдвое больше пациентов (таблица 3).

По данным зарубежных исследований, степень тяжести клинических симптомов сАРК не зависит от реактивности кожи на экстракт пыльцы Амб при постановке кожных проб [13,18], а также от наличия моно- или полисенсibilизации у таких пациентов [12].

Случаи моносенсibilизации к аллергенам Амб и Пол были выявлены крайне редко среди пациентов, проживающих в Чечне. Известно, что в пыльцевых экстрактах присутствуют перекрестно-реагирующие компоненты, которые могут стать причиной двойной сенсibilизации у конкретного пациента [14,19,20]. Кроме того, результаты кожных проб на экстракты аллергенов разных видов Амб (как и Пол) могут отличаться, хотя клинические симптомы совершенно идентичны (например, при аллергии на *A. artemisiifolia* и *A. trifida*) [6].

Экспериментально доказано, что рост Амб и продукция ее пыльцы увеличиваются одновременно с повышением концентрации CO_2 в воздухе [14,17,25]. Кроме того, в связи с транспортными и промышленными выбросами городская Амб растет быстрее и ее пыление начинается раньше, чем Амб, которая выращена за городом [25]. В Урус-Мартановском районе отсутствуют крупные промышленные объекты, а к местным факторам можно

отнести лишь географическое расположение Чечни: сложный, сильно расчлененный рельеф и близость Каспийского моря, что существенно влияет на климат данного региона Северного Кавказа. Вместе с тем одной из основных причин резкого расширения ареала произрастания амброзии, включая высокоразвитые европейские страны, считается отсутствие единой стратегии борьбы с этим карантинным растением в связи с глобализацией торговли и изменением климата [10,11,21]. Не ясна также роль пыльцы других сорных растений в патогенезе респираторной аллергии (например, лебеды, подсолнуха, подорожника) [15].

Последние данные свидетельствуют о том, что уровень специфических IgE антител к отдельным молекулам аллергенов (компонентам аллергена), а не целому экстракту аллергенов, может оказаться более полезным в дифференциации спектра сенсибилизации в зависимости от тяжести БА [14,19,20]. Кроме того, перекрестные реакции не только с другими видами Амб, но часто и с близкородственной Пол, следует иметь в виду при диагностике поллиноза и назначении АСИТ таким пациентам [7,8].

Таким образом, это первое комплексное исследование распространенности аллергии к наиболее распространенным сорнякам в Чеченской Республике. Полученные результаты указывают, что приблизительно 26% и 21% пациентов имеют аллергию к Амб и Пол соответственно. Дальнейшие исследования на молекулярном уровне помогут установить географические особенности профиля сенсибилизации к главным компонентам Амб и Пол. Такой подход может иметь важное значение в правильном подборе АСИТ – единственном методе, способном видоизменить течение аллергических заболеваний [7-9,10,12,14].

ЛИТЕРАТУРА

1. Багамаева З.Г. Поллиноз у детей и подростков в Республике Дагестан. Автореф. дис. канд. мед. наук. Астрахань, 2010. с. 21.
2. Бурдули Н.Н., Гагагонова Т.М., Кцоева С.А. и др. Региональные особенности сенсибилизации больных с поллинозом в Республике Северная Осетия-Алания. Владикавказский медико-биологический вестник. 2015.- Т. 20. №. 30.- С. 101-104.
3. Виноградова Ю. К., Майоров С. Р., Хорун Л. В. Чёрная книга флоры Средней России (Чужеродные виды растений в экосистемах Средней России) / Отв. ред. Ю. Ю. Дгебуадзе; науч. ред. А. С. Демидов; РАН, ГБС им. Цицина; Секция инвазий чужеродных видов Комиссии РАН по сохранению биол. Разнообразия; Программа фонд. иссл. Президиума РАН «Биоразнообразие и динамика генофондов». — М.: Геос, 2009. — с. 127.
4. Орехова О.Ю., Федотова Н.В., Готовчикова А.А., Лузан Е.С. Распространенность сезонного аллергического

ринита в Краснодарском крае, вызванного цветением сорных трав, и способы борьбы с амброзией полынно-листной. Межрегиональный форум с международным участием «Клиническая иммунология и аллергология – междисциплинарные проблемы» (30 мая-01 июня 2016 г., Казань). Российский аллергологический журнал. 2016. - Т. 2. №3. - С. 103.

5. Садовничая Л.Т. Амброзийный поллиноз у детей. Автореф. дис. д-ра мед. наук. М., 2002. с. 45.
6. Хабибулина Л.Р., Мягкова М.А., Манжос М.В. Вопросы этиологии поллиноза в Самаре. Материалы V конференции АДАИР по детской аллергологии и иммунологии для практикующих врачей, 18-19 ноября 2016 г., Москва, с. 37.
7. Asero R., Bellotto E., Ghiani A. et al. Concomitant sensitization to ragweed and mugwort pollen: who is who in clinical allergy? *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2014; 113:307-13.
8. Asero R., Weber B., Mistrello G. et al. Giant ragweed specific immunotherapy is not effective in a proportion of patients sensitized to short ragweed: Analysis of the allergenic differences between short and giant ragweed. *J Allergy Clin Immunol.*, 2005; 116:1036-41.
9. Bousquet J., Anto J., Wickman M. et al. Are allergic multimorbidities and IgE polysensitization associated with the persistence or re-occurrence of foetal type 2 signalling? The MeDALL hypothesis. *Allergy.* 2015;70:1062-78.
10. Bousquet J., Burney P., Zuberbier T. et al. GA2LEN (Global Allergy and Asthma European Network) addresses the allergy and asthma «epidemic». *Ibid.* 2009;64:969-77.
11. Burbach G., Heinzerling L., Rohnelt C. et al. Ragweed sensitization in Europe - GA⁽²⁾LEN study suggests increasing prevalence. *Allergy.* 2009; 64:664-65.
12. Demoly P., Passalacqua G., Pfaar O. et al. Management of the polyallergic patient with allergy immunotherapy: a practice-based approach. *Allergy, Asthma Clin Immunol.*, 2016;12:2.
13. Ellis A., Ratz J., Day A., Day J. Factors that affect the allergic rhinitis response to ragweed allergen exposure. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2010; 104: 293-98.
14. Gadermaier G., Wopfner N., Wallner M. et al. Array-based profiling of ragweed and mugwort pollen allergens. *Allergy.* 2008;63:1543-49.
15. Gadermaier G., Eichhorn S., Vejvar E. et al. Plantago lanceolata: An important trigger of summer pollinosis with limited IgE cross-reactivity. *J Allergy Clin Immunol.*, 2014;134: 472-75.
16. Hamaoui-Laguel L., Vautard R., Liu L. et al. Effects of climate change and seed dispersal on airborne ragweed pollen loads in Europe. *Nat Clim Chang.* 2015;5:766-71.
17. Hyvönen T., Glemmitz M., Radics L., Hoffmann J. Impact of climate and land use type on the distribution of Finnish casual arable weeds in Europe. *Weed Res.* 2011;51:201-08.
18. Jacobs R., Harper N., He W. et al. Responses to ragweed pollen in a pollen challenge chamber versus seasonal exposure identify allergic rhinoconjunctivitis endotypes. *Allergy Clin Immunol.*, 2012;130:122-27.

19. Jahn-Schmid B., Hauser M., Wopfner N. et al. Humoral and cellular cross-reactivity between Amb a 1, the major ragweed pollen allergen, and its mugwort homolog Art v 6. *J Immunol.* 2012;188:1559-67.
20. Matricardi P., Kleine-Tebbe J., Hoffmann H. et al. The EAACI Molecular Allergy User's Guide. *Pediatr Allergy Immunol.* 2016;27 Suppl 23:1-250.
21. Obersteiner A., Gilles S., Frank U. et al. Pollen-Associated Microbiome Correlates with Pollution Parameters and the Allergenicity of Pollen. *PLoS One.* 2016; 11: e0149545.
22. Reznik S.Y. Common ragweed (*Ambrosia artemisiifolia* L.) in Russia: spread, distribution, abundance, harmfulness and control measures. *Ambrosia. The first international ragweed review*, 26. Available at: http://www.zin.ru/labs/expent/pdfs/Reznik_2009_Ambrosia.pdf
23. Sepiashvili R., Khachapuridze D, Chikhladze M, Gamkrelidze S. Aeropollinologic monitoring and distribution of allergoallergens in Western Georgia. *Georgian Med News.* 2015;243:66-70.
24. Shirinde J., Wichmann J., Voyi K. Allergic rhinitis, rhinoconjunctivitis and hay fever symptoms among children are associated with frequency of truck traffic near residences: a cross sectional study. *Environ Health.* 2015; 26;14:84.
25. Ziska L., Beggs P. Anthropogenic climate change and allergen exposure: the role of plant biology. *J Allergy Clin Immunol.* 2012;129:27-32.

SUMMARY

RAGWEED ALLERGY IN THE SOUTH OF RUSSIA - IN THE CHECHEN REPUBLIC

¹Macharadze D., ²Janaeva H., ^{3,4}Avilov K.

¹Peoples Friendship University of Russia, Moscow; ²Janaeva Ch.A., Medical Center, Urus-Martan, Chechnya (Russia); ³Avilov K.K., Institute for Numerical Mathematics of Russian Academy of Sciences, Moscow; ⁴Federal Research Institute for Health Organization and Informatics of Ministry of Health of Russian Federation, Moscow, Russia

Allergy to ragweed pollen and other weeds is a global problem due to the rapid spread of these grasses around the world. In addition, pollen of short ragweed (*Ambrosia*, Amb) and mugwort (*Artemisia*, Art) – one of the main causes of respiratory allergy - seasonal allergic rhinoconjunctivitis (hay fever) with/without bronchial asthma patients living in the South of Russia. Epidemiological studies on the prevalence of Allergy to Amb and Art among patients living in Chechen Republic, absent.

Aim - of this retrospective study was to investigate the prevalence of sensitization to weed pollen in patients of Chechnya.

We surveyed allergy (skin prick tests with 13 inhalant allergens) from 845 patients aged 4-68 years, in Urus-Martan for the period 2013-2016 yrs. Polisensitization was defined as the presence of positive skin tests to 2 or more extracts of different groups of allergens.

~26% and 21% of patients in the Chechen Republic have an allergy to Amb and Art, respectively. Further studies at the molecular level will help to establish the geographical variation of the sensitization profile to the major component of Amb and Art, which could have clinical significance in the proper selection of specific immunotherapy.

Keywords: ragweed, pollen allergy, pollinosis, seasonal allergic rhinitis, prevalence.

РЕЗЮМЕ

АМБРОЗИЙНАЯ АЛЛЕРГИЯ НА ЮГЕ РОССИИ - В ЧЕЧЕНСКОЙ РЕСПУБЛИКЕ

¹Мачарадзе Д.Ш., ²Янаева Х.А., ^{3,4}Авилов К.К.

¹Российский университет дружбы народов, Москва; ²Медицинский центр «Планета здоровья», Урус-Мартан, Чеченская Республика; ³Институт вычислительной математики РАН, Москва; ⁴ЦНИИ Организации и информатизации здравоохранения МЗ РФ, Москва, Россия

Аллергия на пыльцу амброзии и других сорных трав представляет глобальную проблему ввиду стремительного распространения этих трав по всему миру. Кроме того, пыльца амброзии (Амб) и полыни (Пол) – одна из основных причин респираторной аллергии - сезонного аллергического риноконъюнктивита (сАРК, синоним «поллиноз») с/без бронхиальной астмы у пациентов, проживающих на юге России. Эпидемиологические исследования, касающиеся распространенности аллергии на Амб и Пол у пациентов, проживающих в Чеченской республике, отсутствуют.

Целью данного исследования явилось изучение распространенности сенсibilизации к сорным травам у пациентов, проживающих в Чеченской Республике.

Проведено аллергологическое обследование (кожные пробы с ингаляционными аллергенами) у 845 амбулаторных пациентов в возрасте 4-68 лет, обратившихся в Медицинский центр г. Урус-Мартана за период 2013-2016 гг. Полисенсibilизацию определяли как наличие положительных результатов кожных проб на 2 и более экстрактов разных групп аллергенов.

Результаты проведенного исследования позволяют заключить, что около 26% и 21% пациентов Чеченской

Республики имеют аллергию к Амб и Пол соответственно. Дальнейшие исследования на молекулярном уровне помогут установить географические особенности профиля сенсibilизации к главным компонентам Амб и Пол, что может иметь клиническое значение в правильном подборе специфической иммунотерапии.

რეზიუმე

ამბროზიით გამოწვეული ალერგია რუსეთის სამხრეთ ნაწილში - ჩენნეთის რესპუბლიკაში

¹დ. მაჭარაძე, ²ხ. იანავეა, ^{3,4}კ. ავილოვი

¹რუსეთის ხალხთა მეგობრობის უნივერსიტეტი, მოსკოვი, რუსეთი; ²სამედიცინო ცენტრი „პლანეტა ზღოროვია“, ურუს-მარტანი, ჩენნეთი, რუსეთი; ³რუსეთის მეცნიერებათა აკადემიის გამოთვლითი მათემატიკის ინსტიტუტი, მოსკოვი; ⁴რუსეთის ფედერაციის ჯანმრთელობის დაცვის სამინისტროს ჯანმრთელობის დაცვის ორგანიზაციისა და ინფორმაციის ცენტრალური სამეცნიერო-კვლევითი ინსტიტუტი, მოსკოვი, რუსეთი

ამბროზიის მტვერზე და სხვა სარეველა მცენარეებზე ალერგია, ამ მცენარეების მსოფლიოში სწრაფი გავრცელების გამო, გლობალურ პრობლემას წარმოადგენს. ამბროზიის და აბზინდის მტვერი ბრონქული ასთმის თანხლებით, ან მის გარეშე მიმდინარე რესპირაციული ალერგიის -

სეზონური ალერგიული რინოკონიუნქტივიტის (იგივე - პოლინოზი) ძირითადი მიზეზია რუსეთის სამხრეთით მოსახლე პაციენტებში. ჩენნეთის რესპუბლიკაში მცხოვრებ პაციენტთა შორის ამბროზიის და აბზინდის მტვერით გამოწვეული ალერგიის გავრცელების ეპიდემიოლოგიური კვლევა საერთოდ არ ჩატარებულა.

აღნიშნული რეტროსპექტული კვლევის მიზანს წარმოადგენს სარეველა მცენარეებისადმი სენსიბილიზაციის გავრცელების შეფასება ჩენნეთში მცხოვრებ პაციენტებში.

ალერგოლოგიური კვლევა (კანის სინჯი ინპალაციური ალერგენებით) ჩატარდა 4-68 წლის ასაკის 845 ამბულატორიულ პაციენტს, რომლებმაც 2013-2016 წ.წ. მიმართეს ქ. ურუს-მარტანის სამედიცინო ცენტრს. ალერგიული დიაპაზონის პოლისენსიბილიზაცია დადგინდა კანის დადებითი სინჯის არსებობისას სხვადასხვა ჯგუფის ალერგენების 2 და მეტ ექსტრაქტზე.

ჩენნეთის რესპუბლიკაში მცხოვრებ პაციენტთა 26%-ს აღენიშნა ალერგია ამბროზიაზე, ხოლო 21%-ს - აბზინდაზე. მოლეკულურ დონეზე ჩატარებული შემდგომი კვლევებით შესაძლებელი გახდება ამბროზიის და აბზინდისადმი სენსიბილიზაციის ძირითადი კომპონენტების გეოგრაფიული მახასიათებლების დადგენა, რაც უზრუნველყოფს სპეციფიკური იმუნოთერაპიის სწორად შერჩევას.

ОЦЕНКА ДИНАМИКИ ДЛИНЫ ТЕЛОМЕР ЛИМФОЦИТОВ У ИММУНОКОМПРОМЕТИРОВАННЫХ ДЕТЕЙ С ХРОНИЧЕСКИМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ РЕСПИРАТОРНОГО ТРАКТА

¹Халтурина Е.О., ²Нестерова И.В.

¹ГБОУ ВПО Первый московский медицинский университет им. И.М. Сеченова, Москва;

²Российский университет дружбы народов, Москва, Россия

В настоящее время наблюдается тенденция к росту вирусно-вирусных и вирусно-бактериальных инфекций у детей разного возраста, что связано с нарушением адекватного функционирования иммунной системы (ИС). Дисфункции лимфоцитов (Лф), как врожденной, так и адаптивной ИС, могут быть сопряжены с процессом ускоренного укорочения концевых структур хромосом - теломер.

Каждое деление соматической клетки сопровождается укорочением ДНК, входящей в состав концевых струк-

тур хромосом, а поскольку теломерная ДНК не несёт смысловых генов, такое укорочение не приводит к потере генетической информации и является одним из главных механизмов поддержания стабильности генома делящихся клеток [3]. Потеря части теломерной ДНК в процессе каждого деления проявляется и тем, что с возрастом (особенно быстро у детей) укорачиваются теломеры всех соматических клеток организма, включая теломеры клеток периферической крови [1,10,11]. Возрастное укорочение теломер может быть ускорено многими факторами, вызывающими продукцию актив-

ных форм кислорода (оксидативный стресс), в связи с чем одной из универсальных причин ускоренного укорочения теломер является хроническое воспаление [6]. У детей наиболее изучены изменения теломер при хронической ВИЧ-инфекции, инфекционном мононуклеозе [5,9] и других «моноинфекциях», однако на практике часто определяется сочетание двух и более инфекций вирусной и бактериальной этиологии.

Целью данного исследования явилось определение длины теломер лимфоцитов у детей, страдающих хроническими заболеваниями респираторного тракта, ассоциированными с микст-герпес-вирусными и бактериальными ко-инфекциями (синуситы, тонзиллиты, бронхиты), инфицированными хламидиями, микоплазмой, вирусами простого герпеса, Эпштейна-Барр и цитомегаловирусом в различных сочетаниях, и детей, у которых антитела к данным инфекциям не выявлены.

Материал и методы. Венозную кровь забирали у детей с хроническими заболеваниями респираторного тракта (ХЗРТ) строго по показаниям. Для детекции герпес-вирусных и бактериальных инфекций использовались методы серодиагностики - IgM VCA EBV, IgG VCA EBV, IgM CMV, IgG CMV IgM HSV1/2, IgG HSV1/2, IgM и IgG к *Mycoplasma pneumoniae* и *Chlamidia trachomatis* с применением иммуноферментных тест-систем производства НПО «Диагностические системы» (Россия), и ELISA производства DRG (Германия).

Из общего объема забранной крови сразу выделяли 1-2 мл, стабилизировали гепарином и отстаивали 30-45 мин для получения лейкоцезы. Лейкоцезу дважды отмывали в 5 мл PBS (забуференный фосфатами физраствор, приготовленный из PBS Tablets, Helicon, Россия), осадок клеток восстанавливали в 1 мл 4% формальдегида с 0,1% Tween 20, инкубировали 1 час при комнатной температуре и однократно отмывали в PBS. Полученный осадок фиксированных клеток суспендировали в 1 мл раствора 10% диметилсульфоксида с 1% бычьего сывороточного альбумина (BSA, Sigma, США), замораживали при -20°C и хранили, в зависимости от срока хранения, при -20 или -80°C.

Определение количества теломерной ДНК проводили после оттаивания и однократной отмывки клеток методом Flow-FISH [8,10], который подробно представлен нами ранее [3]. Клетки инкубировали 10 мин при 80°C в гибридизационном растворе, состоящем из 70% формамида с 20 mM Tris (pH=7,1) и 1% BSA (все реактивы Sigma, США) в присутствии 3 мкг/мл пептидо-нуклеиновой кислоты (PNA) флюоресцеин-(CCCTAA)₃ (Eurogentec, Бельгия). В контрольные пробы PNA не добавляли. Далее пробы инкубировали на качающейся платформе при комнатной температуре в течение 2-х часов в темноте. Затем клетки дважды отмывали гибридизационным раствором с добавлением

0,1% Tween 20, однократно в PBS (также с 0,1% Tween 20), осадок суспендировали в 1% растворе формальдегида в PBS с красителем ДНК 7-аминоактиномицином Д (7-ААД) в концентрации 2 мкг/мл и хранили при 4°C до исследования.

Пробы исследовали на цитофлуориметре FACScan в программе CellQuest (Beckton Dickinson, США), оценивали интенсивность флюоресценции PNA, соответствующую количеству TTAGGG-повторов теломерной ДНК, в единичных клетках лимфоцитарного «поля» (агрегаты из двух и более клеток идентифицировали с помощью флюоресценции 7-ААД и в счёт не включали). За показатель флюоресценции PNA принимали разницу между величиной средней интенсивности флюоресценции исследованных клеток в опыте (PNA+) и таковой в контроле (PNA-). Параллельно клеткам лейкоцезы исследуемых пациентов, точно также обрабатывали клетки линии 1301 в качестве стандарта. Интенсивность флюоресценции исследованных образцов сравнивали с таковой стандарта и высчитывали абсолютное содержание теломерной ДНК, выраженное в количестве тысяч пар нуклеотидов (ТПН), опираясь на предварительно полученные результаты исследования длины терминальных ДНК повторов (TRF) в клетках 1301 и лимфоцитах 5-ти разных доноров крови методом Southern Blotting.

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью MS Excel, оценивая достоверность показателей регрессии, различий средних величин и долей (в процентах) с применением критерия Стьюдента.

Результаты и их обсуждение. Изучена длина теломер у 77 детей, в возрасте от 4 до 7 лет, страдающих хроническими заболеваниями респираторного тракта (ХЗРТ), ассоциированными с микст-герпес-вирусными и бактериальными коинфекциями.

Количество теломерной ДНК (тДНК) лимфоцитов у обследованных детей и их возраст представлены в таблице 1. В зависимости от результатов присутствия антител, дети были разделены на две группы. Контрольную группу составили 15 детей, сопоставимых по полу и возрасту, страдающих ХЗРТ, но серонегативных по микст-герпес-вирусным и бактериальным коинфекциям. Основная группа включала детей (n=62), страдающих ХЗРТ, серопозитивных по ко-инфекциям вирусной и бактериальной природы.

Из таблицы 1 явствует, что среднее количество тДНК лимфоцитов в основной группе было достоверно меньше, чем в контрольной группе. Учитывая достоверную разницу в возрасте детей этих групп, и наиболее выраженное укорочение теломер лимфоцитов с возрастом именно у детей, мы попытались выяснить в данном случае зависят или нет различия длины теломер от

Таблица 1 Зависимость количества тДНК лимфоцитов от возраста обследованных детей

Параметр\группа	Все дети n=77	Контрольная группа n=15	Основная группа n=62	Разность показателей групп 1 и 2
ТПН	10,280±0,502	12,368±,379	9,778±0,580	2,590
Возраст в годах (min – max)	5,31±0,292 (1-14)	3,87±0,332 (2-7)	5,66±0,330 (1-14)	$P_{1-2}=0,032$ 1,79
Расчётное значение ТПН для средней величины возраста группы	10,280 $R_{кр}=0,001$	12,360 $R_{кр}=0,005$	9,778 $R_{кр}=0,007$	2,586

возраста детей. С этой целью проведён регрессионный анализ зависимости длины теломер от возраста в каждой исследуемой группе. Как видно из таблицы 1, расчётные величины ТПН тДНК, во-первых, судя по величине Р коэффициента регрессии ($R_{кр}$), высоко достоверны. Во-вторых, эти величины практически совпадают со средними величинами ТПН в исследуемых группах, полученными опытным путём, и, главное, их разность совпадает с разностью средних величин ТПН контрольной и основной групп. Вышеприведенное свидетельствует, что сравнение средних величин ТПН этих групп выявляет их различия, зависящие от возраста, что не позволяет сделать вывод о различиях длины теломер лимфоцитов между детьми серопозитивной и серонегативной групп (контрольной и основной), зависящей от присутствия антител.

Учитывая выявленную зависимость длины теломер лимфоцитов от возраста всех обследованных детей ($R_{кр}=0,001$), мы оценили индивидуальное распределение длины теломер лимфоцитов относительно линии регрессии, отражающей эту зависимость. Задачей такой оценки было определение количества “попаданий” индивидуальных значений количества тДНК выше или ниже математически ожидаемой величины ТПН (МОВ_{тпн}) для каждого возраста с интервалом в 1 год в контрольной и основной группах с целью последующего сравнения этих количеств, выраженных в процентах.

Результаты анализа, представленные в таблице 2, демонстрируют достоверно более высокий (почти в 3 раза) процент детей, имеющих длину теломер лимфоцитов меньше МОВ_{тпн} для их возраста в основной группе (серопозитивных) в сравнении с контрольной группой (серонегативных). Это свидетельствует о том, что теломеры лимфоцитов детей, имеющих антитела к антигенам вирусов и (или) бактерий, короче, чем у серонегативных детей того же возраста.

Далее проведен подобный анализ для групп детей, различающихся по специфичности антител: в основную группу А включили детей с антителами к антигенам бактерий, в группу Б – к вирусам и в группу В – как к бактериям, так и к вирусам. Из таблицы 3 явствует, по сравнению с контрольной группой, достоверно больший процент детей, имеющих теломеры лимфоцитов короче МОВ_{тпн} для своего возраста, выявлен в группах Б и В (соответственно, с антителами к вирусам и к вирусам в сочетании с антителами к бактериям). В группе А (антитела только к бактериям) подобных изменений не выявлено.

Результаты исследования демонстрируют снижение количества теломерной ДНК лимфоцитов у детей, у которых выявлены антитела против антигенов вирусов, либо против вирусов в сочетании с антителами против антигенов бактерий в сравнении с детьми того же возраста, однако у которых антитела не выявлены, либо выявлены антитела только против бактерий.

Таблица 2. Процент детей, у которых количество тДНК лимфоцитов меньше математически ожидаемой величины для их возраста

Показатель\группа	Все дети n=77	Контрольная группа, n=15	Основная группа, n=62
% детей с ТПН ниже линии регрессии	54,5±5,65 (42 из 77)	20,0±10,33 (3 из 15)	62,9±6,13 (39 из 62)
Достоверность различий			$P_{1-2}<0,01$

Таблица 3. Процент детей с количеством тДНК лимфоцитов меньше МОВ_{тпн} в группах с антителами к разным видам инфекции

Показатель\группа	Контрольная группа	Основная группа А	Основная группа Б	Основная группа В
% детей с ТПН ниже линии регрессии	20,0±10,33	33,3±15,71	67,6±8,02	68,4±10,66
Количество наблюдений	15	9	34	19
Достоверность различий с группой 1		$P>0,05$	$P<0,01$	$P<0,05$

Следует подчеркнуть, что полученные данные касаются только больных детей и демонстрируют их гетерогенность по показателям серопозитивности и длине теломер, укорочение которой оказалось ассоциированным с наличием антител против исследованных вирусов. Такое укорочение вполне объяснимо, если принять во внимание многочисленные данные о способности вирусных компонентов (благодаря родству и даже идентичности с некоторыми компонентами теломер) взаимодействовать с теломерной ДНК, белками, участвующими в организации структуры теломер и формировании гетерохроматина, а также с теломеразой [7]. С другой стороны, персистирующая вирусная инфекция, активирующая вирус-специфические Т-клетки либо в периоды репликации, либо обеспечивая постоянную презентацию антигенов вируса даже в латентном периоде, приводит к накоплению массы Т-клеток с укороченными теломерами [2,9], что отражается на средней длине теломер циркулирующего пула лимфоцитов. Укорочение теломер вызывает и оксидативный стресс, сопровождающий хроническое воспаление, присутствующее у обследованных нами детей, однако вклад этого фактора невозможно оценить, поскольку не сравнить длину теломер серонегативных детей (и детей с антителами против антигенов бактерий) со здоровыми детьми не удалось, так как последние по этическим соображениям в исследовании не участвовали.

Выводы. Таким образом, результаты проведенного исследования позволяют сделать вывод об укорочении теломер лимфоцитов у детей с хроническими заболеваниями респираторного тракта, у которых выявлены антитела к цитомегаловирусу, вирусу простого герпеса и Эпштейна-Барр в разных сочетаниях (в том числе с антителами к бактериям), по сравнению с серонегативными детьми того же возраста и детьми, у которых выявлены антитела к *Chlamydia trachomatis* и (или) *Mycoplasma pneumoniae* без антител к вирусам. Эти данные свидетельствуют о том, что наличие персистирующей вирусной инфекции более всего влияет на укорочение теломер лимфоцитов у детей с хроническими заболеваниями респираторного тракта.

ЛИТЕРАТУРА

1. Aubert G., Lansdorp P.M. Telomeres and Aging. *Physiol. Rev.* 2008; 88: 557–579.
2. van de Berg P.J.E.J., Griffiths S.J., Yong, S-L, Macaulay R., Jackson S., Henson S.M., ten Berge I.J.M., Akbar A.N., van Lier A.W. Cytomegalovirus Infection Reduces Telomere. *J. Immunol.* 2010; 184: 3417-3423.
3. Blackburn E.H. Structure and function of telomeres. *Nature* 1991; 350: 569-572.
4. Borissov V.I. (Борисов В.И., Кожевников В.С., Сеньюков В.В., Сизиков А.Э., Коненкова Л.П., Герцог О.А., Козлов В.А. Укорочение длины теломер моноцитов при ревматоидном артрите. *Мед. иммунология* 2006; 1: 87-90.

5. Côté H.C.F., H. Soudeyns, A. Thorne et al. Leukocyte Telomere Length in HIV-Infected and HIV-Exposed Uninfected Children: Shorter Telomeres with Uncontrolled HIV Viremia. *PLOS ONE* 2012; 16 (online).
6. Effros R.B. Telomere/telomerase dynamics within the human immune system: Effect of chronic infection and stress. *Experimental Gerontology* 2011; 46: 135–140.
7. Deng Z., Wang Z. and Paul M. Lieberman P.M. Telomeres and viruses: common themes of genome maintenance. *Front. Oncol.* 31 December 2012 (<http://dx.doi.org/10.3389/fonc.2012.00201>)
8. Hultdin M., Gronlund E., Norrback K.F., Eriksson-Lindstrom E., Just T., Roos G. Telomere analysis by fluorescence in situ hybridization and flow cytometry. *Nucleic Acids Res.* 1998; 26: 3651–3656.
9. Plunkett F.J., Soares M.V.D., Annels N., Hislop A., Ivory K, Lowdell M., Salmon M., Rickinson A, Akbar A.N. The flow cytometric analysis of telomere length in antigen-specific CD8 T cells during acute Epstein-Barr virus infection. *Blood* 2001; 97: 700-707.
10. Rufér N., Dragowska W., Thornbury G., Roosnek E., Lansdorp P.M. Telomere length dynamics in human lymphocyte subpopulations measured by flow cytometry. *Nat. Biotechnol.* 1998; 16: 743–747.
11. Zeichner S.L, Palumbo P., Feng Y.R., Xiao X., Gee D., Sleasman J., Goodenow M., Biggar R., Dimitrov D. Rapid Telomere Shortening in Children. *Blood.* 1999; 93: 2824-2830.

SUMMARY

EVALUATION OF DYNAMIC TELOMERE LENGTH SHORTENING OF LYMPHOCYTES IN IMMUNOCOMPROMISED CHILDREN WITH CHRONIC DISEASES OF THE RESPIRATORY

¹Khalturina E., ²Nesterova I.

¹I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow; ²Russian University of peoples friendship, Moscow, Russia

Nowadays it is common to observe the growth of viral-viral and viral-bacterial co-infections in children of different ages, due to dysfunction of lymphocytes (DL), which can be connected with the process of the accelerated shortening of the end structures of chromosomal telomeres, telomere length changes are described in lymphocytes of children with chronic mono-infections.

The conducted study has shown the shortening of telomere lymphocytes in children with CDRT seropositive for mixed-herpes viral infections (herpes simplex virus, virus, Epstein-Barr virus and cytomegalovirus in various combinations) and for bacterial co-infections - *Chlamydia trachomatis* and (or) *Mycoplasma pneumoniae*. The use of regression analysis and attribute analysis (in percent) made

possible to neutralize age-groups differences of seropositive and seronegative children.

Thus showed that children, who suffer from chronic diseases of the respiratory tract associated with mixed-herpes viral and bacterial co-infections, have more pronounced telomere shortening of lymphocytes than seronegative children of the same age.

Keywords: lymphocytes, telomeres, immunocompromised children, co-infections.

РЕЗЮМЕ

ОЦЕНКА ДИНАМИКИ ДЛИНЫ ТЕЛОМЕР ЛИМФОЦИТОВ У ИММУНОКОМПРОМИТИРОВАННЫХ ДЕТЕЙ С ХРОНИЧЕСКИМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ РЕСПИРАТОРНОГО ТРАКТА

¹Халтурина Е.О., ²Нестерова И.В.

¹ГБОУ ВПО Первый московский медицинский университет им. И.М. Сеченова, Москва; ²Российский университет дружбы народов, Москва, Россия

В настоящее время наблюдается тенденция к росту вирусно-вирусных и вирусно-бактериальных коинфекций у детей разного возраста, что обусловлено дисфункцией лимфоцитов, сопряженной с процессом ускоренного укорочения концевых структур хромосом - теломер. Авторами статьи описаны изменения длины теломер в лимфоцитах детей, страдающих хроническими заболеваниями респираторного тракта (ХЗРТ), ассоциированными с микст-герпес-вирусными и бактериальными ко-инфекциями. При проведении сравнительного исследования установлено укорочение теломер лимфоцитов у детей с ХЗРТ серопозитивных по микст-герпес-вирусным инфекциям (вирус простого герпеса, Эпштейна-Барр и цитомегаловирус в различных комбинациях) и бактериальным коинфекциям - *Chlamydia trachomatis* и/или *Mycoplasma pneumoniae*. Применение регрессионного анализа и анализа альтернативных признаков (в процентах) позволило нивелировать возрастные отличия серопозитивной и серонегативной групп.

Таким образом, продемонстрировано, что у детей, страдающих хроническими заболеваниями респираторного тракта, ассоциированными с микст-герпес-вирусными и бактериальными коинфекциями, имеет место более выраженное укорочение теломер лимфоцитов, чем у серонегативных детей того же возраста.

რეზიუმე

ლიმფოციტების ტელომერების სიგრძის დინამიკის შეფასება რესპირაციული სისტემის ქრონიკული დაავადების მქონე იმუნოკომპრომიტირებულ ბავშვებში

¹ე. ხალტურინა, ²ი. ნესტეროვა

¹სახელმწიფო საბიუჯეტო ზოგადსაგანმანათლებლო დაწესებულება, უმაღლესი პროფესიული განათლების ი. მ. სეჩენოვის სახელობის მოსკოვის პირველი სამედიცინო უნივერსიტეტი, მოსკოვი; ²რუსეთის ხალხთა მეგობრობის უნივერსიტეტი, მოსკოვი, რუსეთი

დღესდღეობით სხვადასხვა ასაკის ბავშვებში შეინიშნება ვირუს-ვირუსული და ვირუს-ბაქტერიული კოინფექციების ზრდის ტენდენცია, რაც ლიმფოციტების დისფუნქციითაა განპირობებული და ასოცირებულია ქრომოსომების სტრუქტურის საბოლოო უზნების - ტელომერების დამოკლების პროცესის აჩქარებასთან. ავტორების მიერ აღწერილია ლიმფოციტების ტელომერების სიგრძის ცვლილებები შერეულ ჰერპეს-ვირუსულ და ბაქტერიულ კოინფექციასთან ასოცირებული რესპირაციული სისტემის ქრონიკული დაავადებების მქონე ბავშვებში.

ჩატარებული შედარებითი კვლევით დადგენილია ლიმფოციტების ტელომერების დამოკლება რესპირაციული სისტემის ქრონიკული დაავადებების მქონე სეროდადებით ბავშვებში, რომლებსაც აღნიშნებოდა შერეული ჰერპეს-ვირუსული ინფექციები (ჩვეულებრივი ჰერპესის ვირუსი, ეპშტეინ-ბარის ვირუსი და ციტომეგალოვირუსი სხვადასხვა კომბინაციაში) და ბაქტერიული კოინფექცია - *Chlamydia trachomatis* ან/და *Mycoplasma pneumoniae*. რეგრესული და ალტერნატიული ნიშნების ანალიზის (პროცენტებში) გამოყენებამ შესაძლებელი გახადა ასაკობრივი განსხვავების ნიველირება სეროპოზიტიურ და სერონეგატიურ ჯგუფებს შორის.

ნაჩვენებია, რომ შერეულ ჰერპეს-ვირუსულ და ბაქტერიულ კოინფექციასთან ასოცირებული რესპირაციული სისტემის ქრონიკული დაავადებების მქონე ბავშვებში აღინიშნება ლიმფოციტების ტელომერების უფრო გამოხატული დამოკლება, იგივე ასაკის სერონეგატიურ ბავშვებთან შედარებით.

ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ЛИМФОЦИТОВ ПРИ ГЕМОРРАГИЧЕСКОЙ ЛИХОРАДКЕ С ПОЧЕЧНЫМ СИНДРОМОМ

¹Иванов М.Ф., ²Балмасова И.П., ¹Васнёва Ж.П.

¹Самарский государственный медицинский университет, Самара, Российская Федерация;

²Российский университет дружбы народов, Москва, Российская Федерация

Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (ГЛПС) - природно-очаговая вирусная инфекция, источником заражения являются дикие грызуны - носители хантавирусов Хантаан, Пуумала, Сеул и Добрава. Заболевание у человека протекает довольно тяжело и проявляется острой почечной недостаточностью, интоксикацией, болевым и геморрагическим синдромом при выраженной цикличности течения [4].

Хантавирусы как возбудители ГЛПС обладают значительным влиянием на характер иммунного ответа, в котором ведущая роль в эрадикации вируса принадлежит CD8+ цитотоксическим Т-лимфоцитам (ЦТЛ) [18], в то время как на тяжесть течения заболевания в значительной мере влияют CD4+ Т-хелперы 1-го типа [19] и FoxP3+ регуляторные Т-клетки (Трег) [14]. Установлено, что, помимо вирусов, причиной иммунологических сдвигов может служить поражение почечной ткани, как это показано при других вирусных инфекциях [5].

Сведения о роли лимфоцитов врожденного иммунного ответа - естественных киллеров (ЕК) и естественных киллерных Т-клеток (ЕКТ) представлены в виде единичных сообщений, например, о цитокинной регуляции ЕК при ГЛПС [8]. В то же время особый интерес при ГЛПС представляет соотношение роли клеток, обладающих цитолитической активностью - цитотоксических Т-лимфоцитов, естественных киллеров, отчасти ЕКТ, поскольку известно, что в формировании протективного иммунитета при вирусных инфекциях, сопровождающегося формированием иммунологической памяти, основное участие принимают клетки адаптивного иммунного ответа - ЦТЛ [6].

В запуске цитолитического поражения вирусинфицированных клеток лимфоцитами указанных категорий довольно значительную роль играют лектиновые рецепторы NKG2D, которые распознают так называемые неклассические молекулярные продукты МНС-I, экспрессируемые клетками организма только в условиях патологического процесса, в том числе при поражении вирусами [1,2,6]. Особенности экспрессии этого рецептора при ГЛПС по сей день не охарактеризованы.

Исходя из вышеизложенного, целью исследования явилось определение фенотипических особенностей лимфоцитов с цитотоксической активностью при геморрагической лихорадке с почечным синдромом в их взаимосвязи с клетками иммунной системы других фенотипов.

Материал и методы. Объектом исследования служила кровь 54 больных ГЛПС, поступивших на стационарное лечение в Клинику Самарского государственного медицинского университета с октября 2013 г. по декабрь 2016 г. Забор крови проводился преимущественно в олигурический период заболевания или в начале полиурии. 16 клинически здоровых лиц, соответствующие по полу и возрасту основной группе, составили контрольную группу.

Клинический диагноз ГЛПС верифицировался серологически путем определения IgM и IgG антител к нуклеокапсидному белку хантавирусов методом иммуноферментного анализа с использованием парных сывороток. Тяжелое течение ГЛПС устанавливалось на основании следующих критериев: температура выше 40°C в течение 7 дней и более, интенсивная головная боль, частая рвота, инфекционно-токсический шок 2-3 стадии, множественные кровоизлияния и кровотечения, тромбоцитопения менее 100 клеток на 10⁹/л, олигоурия свыше 6 дней, протеинурия более 3 г/л, мочевины более 20 ммоль/л, креатинин свыше 0,88 ммоль/л.

Иммунологические методы. Кровь больных и здоровых лиц после автоматизированной пробоподготовки исследовалась методом проточной цитофлуориметрии с использованием аппаратуры «FACS-Perm2» (Beckton Dickinson, USA) и стандартизированного комплекта моноклональных антител BD Multitest 6-Color TBNK Reagent (BD Biosciences), а также меченных PerCP anti-human-CD3 МКАТ, меченных APC anti-human-CD25 МКАТ, меченных FITC anti-human-FoxP3, (BD Biosciences), меченных PC5 anti-CD56 МКАТ, меченных PE anti-CD314 МКАТ (Beckman Coulter).

Статистическая обработка данных проводилась на основе пакета статистических программ SRSS, версия 21. Сравнительная статистика осуществлялась непараметрическим методом с использованием критерия Манна-Уитни, корреляционный анализ - на основе критерия Спирмана.

Результаты и их обсуждение. Результаты определения содержания лимфоцитов различных фенотипов в крови больных ГЛПС при сопоставлении с контролем представлены в таблице 1 и на рисунке 1. При этом на рисунке показаны не собственно значения показателей, а проценты их отклонения (ПО) от контроля, вычисляемые по формуле:

$$PO = \frac{\text{Показатель больного} - \text{Показатель здорового человека}}{\text{Показатель здорового человека}} \times 100\% + 100\%$$

Таблица 1. Фенотипическая характеристика лимфоцитов крови у больных ГЛПС в сравнении с контролем

Тестируемые клетки	Фенотип		Медиана [минимум; максимум] (%)		P
			Больные ГЛПС (n=54)	Здоровые лица (n = 16)	
Т-лимфоциты	CD3+	%	68,0 [44,4; 86,0]	75 [62; 87]	0,008*
		10 ⁹ /л	1,4 [0,64; 4,16]	1,2 [0,7; 3,1]	0,303
Т-хелперы	CD3+CD4+	%	36,1 [5,5; 58,7]	41 [14; 57]	0,038*
		10 ⁹ /л	0,7 [0,35; 1,95]	0,7 [0,4; 1,4]	0,603
ЦТЛ	CD3+CD8+	%	31,8 [10,4; 78,0]	28 [16; 71]	0,173
		10 ⁹ /л	0,64 [0,11; 2,7]	0,4 [0,2; 2,6]	0,049*
ЕКТ	CD3+CD56+	%	5,4 [2,5; 8,1]	3,4 [2,3; 5]	0,041*
		10 ⁹ /л	0,14 [0,02; 1,0]	0,06 [0,04; 0,07]	0,026*
ЕК	CD16+CD56+	%	16,6 [11,0; 33,8]	12,9 [9,5; 28]	0,123
		10 ⁹ /л	0,36 [0,1; 1,75]	0,26 [0,14; 0,42]	0,010*
В-лимфоциты	CD19+	%	12,6 [5,0; 25,0]	10,5 [2,5; 16]	0,159
		10 ⁹ /л	0,21 [0,04; 0,57]	0,18 [0,08; 0,3]	0,226
Активированные Т-клетки	CD3+CD25+	%	4,2 [2,1; 9,6]	7,4 [2,6; 7,8]	0,108
		10 ⁹ /л	0,1 [0,03; 0,33]	0,11 [0,03; 0,2]	0,879
Регуляторные Т-клетки	CD3+CD4+ FoxP3+	%	10,7 [4,0; 27,0]	3,0 [2,3; 8,1]	0,001*
		10 ⁹ /л	0,26 [0,07; 1,8]	0,05 [0,02; 0,2]	0,001*
	CD3+CD8+ FoxP3+	%	12,5 [3,5; 26,1]	0,4 [0,1; 4,4]	0,001*
		10 ⁹ /л	0,27 [0,07; 0,75]	0,01 [0; 0,07]	0,001*
Клетки, экспрессирующие рецептор NKG2D	CD314+	%	48,6 [23,4; 71,6]	12,6 [9,6; 27]	0,001*
		10 ⁹ /л	1,08 [0,27; 3,9]	0,24 [0,14; 0,4]	0,001*

примечание: p - вероятность различий между показателями в группах по критерию Манна-Уитни, * - достоверность различий при p<0,05

При оценке полученные результатов необходимо подчеркнуть, что исследование крови в данном случае лишь относительно отражает события, происходящие в пораженных органах и тканях. Как показывают данные таблицы, изменения иммунного статуса в крови при ГЛПС в сравнении с контролем затрагивают, в первую очередь, различные категории Т-лимфоцитов.

Наблюдается снижение числа Т-лимфоцитов преимущественно за счет Т-хелперов, однако это касается только относительного содержания этих клеток. Подобное падение доли названных клеток среди лимфоцитов не касается их абсолютного количества. В противоположность этим категориям Т-лимфоцитов относительное число цитотоксических Т-клеток достоверно не меняется, но их абсолютное содержание в крови значимо возрастает. Аналогичные изменения наблюдались и со стороны других клеток

с цитотоксической активностью - естественных киллеров. Все параметры ЕКТ достоверно возрастали, а В-лимфоцитов не менялись.

Число активированных Т-клеток, несущих маркер CD25, не менялось, несмотря на развитие инфекционного процесса. На этом фоне многократный рост содержания в крови регуляторных Т-клеток не столько CD4+, сколько абсолютное число CD8+ (в 27 раз), свидетельствует в пользу их индукции из цитотоксических Т-лимфоцитов. Следует отметить, что если у здоровых лиц соотношение CD4+/CD8+ Трег составляет, в среднем, 7,5, то при ГЛПС роль CD8+ регуляторных Т-клеток неизмеримо возрастает, а названное соотношение определяется величиной 0,85. Особого внимания заслуживает и довольно значительный рост числа естественных киллеров, экспрессирующих рецептор NKG2D (CD134+).

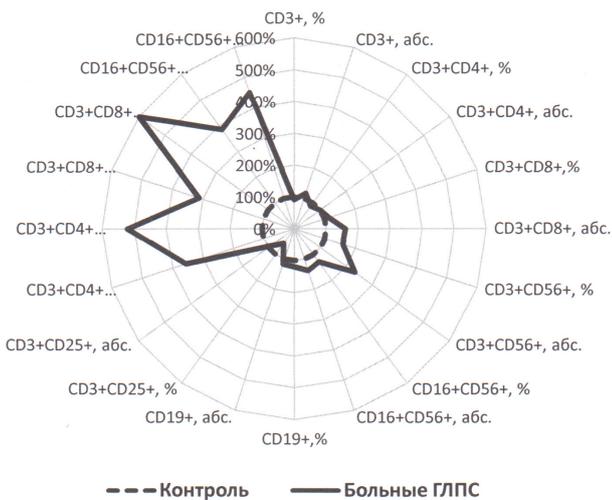


Рис. 1. Процент отклонения от контроля иммунологических показателей больных ГЛПС

Для определения характера взаимосвязей между лимфоцитами различных фенотипов проведен корреляционный анализ с использованием коэффициента корреляции Спирмана. На рисунке 2 представлены положительные и отрицательные корреляционные связи с учтановленной достоверностью ($p < 0,05$).

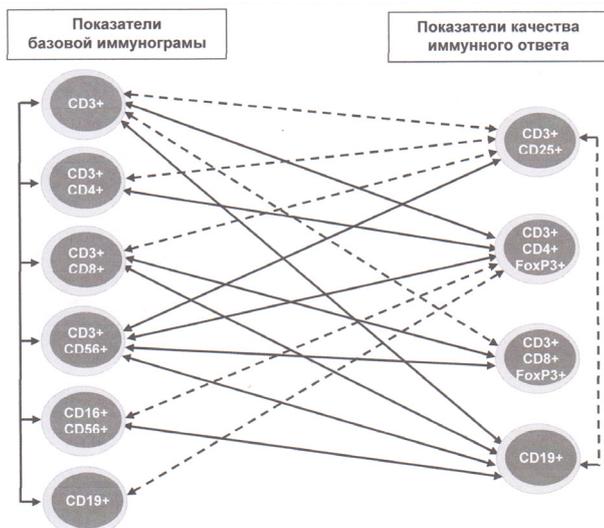


Рис. 2. Достоверные корреляционные связи между клетками иммунной системы различных фенотипов при ГЛПС (↔ - положительные корреляции, ↔ - отрицательные корреляции)

Как следует из рисунка, все традиционно изучаемые популяции и субпопуляции лимфоцитов (базовая иммунограмма) тесно связаны между собой, что вполне естественно в условиях развивающегося инфекционного процесса. При этом наибольшее число корреляций формируют Т-лимфоциты в целом (CD3+), цитотоксические Т-лимфоциты (CD3+CD8+), ЕКТ (CD3+CD56+).

Т-лимфоциты, несущие маркер активации CD25, количество которых при ГЛПС достоверно не отличалось от контроля, были связаны отрицательными корреляциями с числом CD3+, CD3+CD4+, CD3+CD8+, а положительными - только с ЕКТ.

Особый интерес представляет анализ корреляционных связей регуляторных Т-клеток (Трег), патогенетическая роль которых при ГЛПС подтверждена источниками литературы. CD4+ фенотип этих клеток связан положительными корреляциями с Т-лимфоцитами, Т-хелперами, ЕКТ, то есть клетками, имеющими (для Т-клеток и ЕКТ частично) CD4+ фенотип. Этот факт указывает на возможное происхождение CD3+CD4+FoxP3+ Трег. Эти же клетки связаны отрицательными корреляциями с ЕК и В-лимфоцитами, которые потенциально могут служить объектами супрессорного действия регуляторных CD4+ Т-клеток. Что касается CD8+ Трег, то они входят в состав пар с CD3+CD8+ ЦТЛ и ЕКТ (возможно, с CD8+ субпопуляцией этих клеток) при положительной корреляционной связи между ними. С общим числом Т-лимфоцитов CD8+ Трег при ГЛПС связаны отрицательной корреляцией.

Наконец, клетки, экспрессирующие активирующий лектиновый рецептор NKG2D (CD314+), при ГЛПС формировали только положительные корреляционные связи с клетками, способными проявлять цитотоксическую активность - ЦТЛ, ЕК, ЕКТ, Т-лимфоцитами в целом. Интересно, что с клетками, экспрессирующими другой активирующий рецептор CD25, NKG2D-позитивные клетки связаны отрицательной корреляционной связью.

Ответ на вопрос, в какой степени наблюдаемые особенности иммунного ответа при ГЛПС влияют на тяжесть течения заболевания, получен при сравнении числа клеток различных фенотипов при ГЛПС среднетяжелого и тяжелого течения (таблица 2).

Исходя из данных, представленных в таблице, выявленные ранее весьма значительные отклонения в фенотипическом составе лимфоцитов характеризуют ведущую иммунопатогенетическую особенность ГЛПС - основную роль в иммунном ответе цитотоксических Т-лимфоцитов при поддержке ЕКТ и при значительном участии в иммунном процессе регуляторных Т-клеток, однако все эти отклонения отмечаются независимо от тяжести течения заболевания. В то же время тяжелое течение ГЛПС характеризуется достоверным снижением в крови показателей ЕК и В-лимфоцитов.

Комментируя отмеченные иммунологические изменения, сопровождающие ГЛПС, необходимо остановиться на роли ЦТЛ и ЕК в реализации противовирусного ответа.

Таблица 2. Фенотипическая характеристика лимфоцитов крови у больных ГЛПС в сравнении с контролем с учетом тяжести заболевания

Тестируемые клетки	Фенотип		Медиана [минимум; максимум] (%)		p
			ГЛПС, среднетяжелое течение (n=33)	ГЛПС, тяжелое течение (n=16)	
Т-лимфоциты	CD3+	%	68 [44; 86]	67,5 [62; 82]	0,722
		10 ⁹ /л	1,7 [0,64; 4,16]	1,4 [0,8; 1,55]	0,327
Т-хелперы	CD3+CD4+	%	36 [5,5; 58,7]	37,7 [26,6; 46,1]	0,581
		10 ⁹ /л	0,7 [0,35; 1,95]	0,64 [0,35; 0,95]	0,454
Цитотоксические Т-клетки (ЦТЛ)	CD3+CD8+	%	34 [10,4; 78]	31,6 [20,5; 45,2]	0,488
		10 ⁹ /л	0,9 [0,11; 2,7]	0,54 [0,4; 0,77]	0,165
ЕКТ	CD3+CD56+	%	5,3 [1,7; 30,6]	5,7 [1,0; 11,6]	0,831
		10 ⁹ /л	0,15 [0,02; 1,0]	0,09 [0,02; 0,2]	0,124
Естественные киллеры (ЕК)	CD16+CD56+	%	16,8 [5,0; 53]	12,4 [5,0; 23,8]	0,026*
		10 ⁹ /л	0,4 [0,13; 1,75]	0,23 [0,1; 0,45]	0,042*
В-лимфоциты	CD19+	%	13,5 [5,0; 25,0]	9,5 [7,2; 17]	0,043*
		10 ⁹ /л	0,23 [0,04; 0,57]	0,15 [0,08; 0,2]	0,049*
Активированные Т-клетки	CD3+CD25+	%	4 [1,1; 9,6]	5,9 [2,9; 7]	0,160
		10 ⁹ /л	0,09 [0,03; 0,33]	0,11 [0,05; 0,14]	0,775
Регуляторные Т-клетки	CD3+CD4+ FoxP3+	%	10,6 [4,0; 27,0]	11,6 [7,5; 16,7]	0,381
		10 ⁹ /л	0,26 [0,07; 1,8]	0,24 [0,14; 0,32]	0,684
	CD3+CD8+ FoxP3+	%	13 [3,5; 26,1]	10,8 [3,8; 23]	0,321
		10 ⁹ /л	0,28 [0,11; 0,75]	0,2 [0,07; 0,3]	0,080
Клетки, экспрессирующие рецептор NKG2D	CD314+	%	51 [23,4; 71,6]	47 [33,7; 50,2]	0,121
		10 ⁹ /л	1,33 [0,27; 3,9]	0,85 [0,6; 1]	0,121

примечание: p - вероятность различий между показателями в группах по критерию Манна-Уитни, * - достоверность различий при p<0,05

Полученные нами результаты показали достоверное возрастание значения CD8+ ЦТЛ, в то время как рост ЕК в крови не был столь значительным. Этот факт может быть объяснен тем обстоятельством, что исследование крови проводилось в течение первых 10-12 дней от начала заболевания, а для этого периода ГЛПС более характерно участие в иммунном процессе ЦТЛ [17], а роль ЕК проявляется, как правило, гораздо позднее [7].

Мишенью для тех и других лимфоцитов при ГЛПС служат эндотелиальные клетки, пораженные хантавирусом [11] с той разницей, что ЦТЛ распознают инфицированные клетки с помощью рецепторов, специфичных к вирусным антигенам [6,18], а ЕК - через систему ингибирующих и активирующих рецепторов, реагирующих на молекулы МНС-I [2,15]. Обе категории клеток реализуют цитотоксические эффекты одним и тем же

механизмом, который сопровождается их дегрануляцией с высвобождением перфорина и гранзима В, при этом перфорин способствует проникновению гранзима В в клетку-мишень, а гранзим В активирует каспазу 3 и запускает апоптоз пораженной вирусом клетки [9,10,16]. Хантавирусы способны вмешиваться в этот процесс, поскольку белки их нуклеокапсида обладают способностью инактивировать такие ферментные системы как гранзим В и каспаза 3, в результате клетка эндотелия не подвергается цитолизу, создавая условия для размножения возбудителя ГЛПС [12].

Следует остановиться и на установленном нами феномене преимущественного вовлечения лимфоцитов с цитотоксическими свойствами в иммунный процесс через экспрессию активирующего лектинового рецептора NKG2D, корреляционно связанную с ЦТЛ, ЕКТ, ЕК.

Следует отметить, что способность к экспрессии лектинового рецептора NKG2D могут демонстрировать многие клетки иммунной системы. К ним принадлежат, в первую очередь, клетки с цитотоксической активностью - ЕК, ЕКТ, $\gamma\delta$ Т-клетки, CD8+ Т-клетки, определенные категории CD4+ Т-клеток [13, 20], однако существуют различия в функционировании NKG2D на мембране названных клеток [1]. В частности, этот рецептор по-разному реализует поступающие от него сигналы у естественных киллеров и цитотоксических Т-лимфоцитов. Лигандами для этого рецептора служат, как правило, стресс-индуцибельные молекулы МІСА и МІСВ на поверхности вирусинфицированных и других патологически измененных клеток [1, 2]. При вирусных инфекциях у ЕК при этом включаются 2 сигнальных пути - с участием адаптерных молекул Dap12 (через Syc) и Dap10 (через PI3-киназу), а у ЦТЛ - только с участием Dap10 [15]. В результате у ЕК взаимодействие NKG2D со своими лигандами ведет как к цитотоксическому эффекту, так и высвобождению цитокинов, а цитотоксические Т-клетки используют сигналы, поступающие через NKG2D, только для своей активации [21].

В то же время при тяжелом течении ГЛПС показатель ЕК, как было установлено, достоверно уменьшается, понижая эффективность цитотоксических и секреторных механизмов противовирусного ответа.

Что касается механизмов понижения ЕК, то, по нашим данным, оно корреляционно связано с возрастанием числа регуляторных Т-клеток, что подтверждается данными литературы [14]. Нами установлено, что при ГЛПС значительно возрастает доля CD8+ Трег. Источником индукции этих клеток могут служить как ЦТЛ, так и ЕКТ. Однако известно, что для образования регуляторных Т-клеток имеет значение усиленная экспрессия лимфоцитами рецептора CD25 [6], чего не было отмечено для цитотоксических Т-лимфоцитов. Такая возможность показана в ходе корреляционного анализа для ЕКТ - субпопуляции, наличие которой в крови при ГЛПС достоверно возрастало. Известно, что ЕКТ могут иметь три фенотипа: CD4+, CD8+, CD4-CD8- [2], при этом именно CD8+ фенотип характеризуется супрессорной активностью [3], что позволяет рассматривать их как CD8+ регуляторные Т-клетки.

Заключение. Проведенные исследования показали, что в иммунных механизмах геморрагической лихорадки с почечным синдромом ключевая роль принадлежит цитотоксическим Т-лимфоцитам, наряду с ЕКТ и CD8+ регуляторными Т-клетками. При этом процессы активации лимфоцитов с цитотоксическими свойствами тесно связаны с экспрессией лектинового рецептора NKG2D. Иммунологическими признаками тяжелого течения ГЛПС может служить

отсутствие роста со стороны содержания естественных киллеров в крови и достоверное падение числа В-лимфоцитов, корреляционно связанное с CD8+ регуляторными Т-клетками.

ЛИТЕРАТУРА

1. Малова Е.С., Балмасова И.П., Ющук Н.Д. и др. Связь между экспрессией рецепторов лектинового типа нормальными киллерами и выраженностью фиброза печени при хроническом вирусном гепатите С. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии 2010; 6; 48-52.
2. Сепиашвили Р.И., Балмасова И.П. Физиология естественных киллеров. Москва: Медицина-Здоровье 2005; 88-102.
3. Сепиашвили Р.И., Балмасова И.П. Физиологические основы функционирования новой субпопуляции лимфоцитов – ЕКТ. Аллергология и иммунология 2005; 6; 14-22.
4. Ткаченко Е.А., Бернштейн А.Д., Дзагурова Т.К. и др. Актуальные проблемы геморрагической лихорадки с почечным синдромом. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии 2013; 1; 51-58.
5. Ющук Н.Д., Гаджикулиева М.М., Балмасова И.П. и др. Роль иммунных факторов в прогрессировании хронических заболеваний почек при ВИЧ-инфекции. Терапевтический архив 2016; 88; 56-61.
6. Ярилин А.А. Иммунология. Москва: ГЭОТАР-Медиа 2010, 149-166.
7. Björkström N.K., Lindgren T., Stoltz M. et al. (2011) Rapid expansion and long-term persistence of elevated NK cell numbers in humans infected with hantavirus. J Exp Med 2011; 208; 13–21.
8. Braun M., Björkström N.K., Gupta S. et al. NK cell activation in human hantavirus infection explained by virus-induced IL-15/IL15Ra expression. PLoS Pathog 2014; 10; e1004521.
9. Bryceson Y.T., Ljunggren H.G. Lymphocyte effector functions: armed for destruction? Curr Opin Immunol 2007. 19; 337–338.
10. Chowdhury D., Lieberman J. Death by a thousand cuts: granzyme pathways of programmed cell death. Annu Rev Immunol 2008; 26; 389–420.
11. Geisbert T.W., Jahrling P.B. Exotic emerging viral diseases: progress and challenges. Nat Med 2004; 10; 110–121.
12. Gupta S., Braun M., Tischler N.D. et al. Hantavirus-infection confers resistance to cytotoxic lymphocyte-mediated apoptosis. PLoS Pathol 2013; 9; e1003272.
13. Jamieson A.M., Diefenbach A., McMahon C.W. et al. The role of the NKG2D immunoreceptor in immune cell activation and natural killing. Immunity 2002, 17; 19–29.
14. Koivula T.T., Tuulasvaara A., Hetemäki I. et al. Regulatory T cell response correlates with the severity of human hantavirus infection. J Infect 2014; 68; 387-394.

15. Lanier L.L. NK cell recognition. *Annu Rev Immunol* 2005; 23; 225–274.
16. Lieberman J. The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. *Nat Rev Immunol* 2003; 3; 361–370.
17. Lindgren T., Ahlm C., Evander M., et al. Longitudinal analysis of the human T cell response during acute hantavirus infection. *J Virol* 2011; 85; 10252–10260.
18. Liu B., Ma Y., Zhang Y. et al. CD8^{low} CD100⁺ T cells identify a novel CD8 T cell subset associated with viral control during human Hantaan virus infection. *J Virol* 2015; 89; 11834–11844.
19. Ma Y., Yuan B., Zhuang R. et al. Hantaan virus infection induces both Th1 and ThGranzyme B+ cell immune responses that associated with viral control and clinical outcome in humans. *PLoS Pathog* 2015; 11; e1004788.
20. Raulet D.H. Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands. *Nat Rev Immunol* 2003; 3; 781–790.
21. Sentman C.I., Meehan K.R. NKG2D CARs as cell therapy for cancer. *Cancer J* 2014; 20; 156–159.

SUMMARY

PHENOTYPE FACILITIES OF LYMPHOCYTES IN HEMORRHAGIC FEVER WITH RENAL SYNDROME

¹Ivanov M., ²Balmasova I., ¹Vasnyova Z.

¹Samara State Medical University, Samara, Russian Federation; ²Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russian Federation

Hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) is a feral herd disease caused by hantaviruses. HERS may be severe and its manifestations include acute renal failure, intoxication, hemorrhages and pain syndrome. Hantaviruses as pathogen of HFRS wield considerable influence on the character of the immune response, in particular, is capable of lymphocytic cytolysis suppressing. It was found that cytotoxic T lymphocytes along with NKT and CD8 + regulatory T cells play the key role in the immune mechanisms of hemorrhagic fever with renal syndrome. This reduces of the activation of lymphocytes with cytotoxic properties are closely related to the expression of NKG2D lectin receptors. Immunological signs of heavy currents HFRS can serve as a lack of growth on the part of natural killer and a significant drop in the number of b-lymphocytes in the blood, correlative related to the increase in CD8 + regulatory T cells.

Keywords: hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS), cytotoxic T cells, natural killer cells, NKT, regulatory T cells.

РЕЗЮМЕ

ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ЛИМФОЦИТОВ ПРИ ГЕМОРРАГИЧЕСКОЙ ЛИХОРАДКЕ С ПОЧЕЧНЫМ СИНДРОМОМ

¹Иванов М.Ф., ²Балмасова И.П., ¹Васнева Ж.П.

¹Самарский государственный медицинский университет, Самара, Российская Федерация; ²Российский университет дружбы народов, Москва, Российская Федерация

Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (ГЛПС) - природно-очаговая вирусная инфекция, вызываемая хантавирусами. Заболевание у человека протекает довольно тяжело и проявляется острой почечной недостаточностью, интоксикацией, болевым и геморрагическим синдромом. Хантавирусы как возбудители ГЛПС обладают значительным влиянием на характер иммунного ответа, в частности, способны подавлять лимфоцитарный цитолиз. Установлено, что в иммунных механизмах геморрагической лихорадки с почечным синдромом ключевая роль принадлежит цитотоксическим Т-лимфоцитам, наряду с ЕКТ и CD8+ регуляторными Т-клетками. При этом процессы активации лимфоцитов с цитотоксическими свойствами тесно связаны с экспрессией лектинового рецептора NKG2D. Иммунологическими признаками тяжелого течения ГЛПС может служить отсутствие роста со стороны естественных киллеров и достоверное понижение числа В-лимфоцитов в крови, корреляционно связанные с ростом числа CD8+ регуляторных Т-клеток.

რეზიუმე

ლიმფოციტების ფენოტიპური თავისებურებანი ჰემორაგიული ცხელების დროს თირკმლის სინდრომით

¹მ. ივანოვი, ²ი. ბალმასოვა, ¹ჟ. ვასნიოვა

¹სამარის სახელმწიფო სამედიცინო უნივერსიტეტი; ²რუსეთის ხალხთა მეგობრობის უნივერსიტეტი, მოსკოვი, რუსეთის ფედერაცია

ჰემორაგიული ცხელება თირკმლის სინდრომით (HFRS) პანტავირუსებით გამოწვეული ვირუსულ-კეროვანი ინფექციური დაავადებაა. ადამიანებში დაავადება რთულად მიმდინარეობს და ვლინდება თირკმლის მწვავე უკმარისობით, ინტოქსიკაციით, ტკივილით და ჰემორაგიული სინდრომით. პანტავირუსები მნიშვნელოვან გავლენას ახდენს იმუნურ პასუხზე, კერძოდ, მათ შეუძლია ლიმფოციტური ციტოლისის დათრგუნვა. დადგინდა, რომ თირკმლის სინდრომით მიმდინარე ჰემორაგიული

ცხელების იმუნურ მექანიზმებში ციტოტოქსიკურ T-ლიმფოციტებს, EKT და CD8+ რეგულაციურ T-უჯრედებთან ერთად, გადამწყვეტი როლი ენიჭება. ამასთან, ციტოტოქსიკური ლიმფოციტების აქტივაციის პროცესი მჭიდროდაა დაკავშირებული NKG2D ლექტინური რეცეპტორების ექსპრესიასთან. HFRS-ის მძიმედ მიმდინარეობის

იმუნოლოგიურ მასასიათებლებად შეიძლება ჩათვალოს ბუნებრივი „კილერი“ უჯრედების რაოდენობის ზრდის სარწმუნო არარსებობა და B-ლიმფოციტების რაოდენობის სარწმუნო შემცირება სისხლში, კორელაციურად დაკავშირებული CD8+ რეგულაციური T-უჯრედების რაოდენობის ზრდასთან.

ДИНАМИКА ВОЗНИКНОВЕНИЯ И РЕГРЕССИИ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ЭКСТРАЦЕЛЛЮЛЯРНЫХ СЕТЕЙ В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ РАНЕВОГО ИНФЕКЦИОННО-ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ПРОЦЕССА

¹Нестерова И.В., ²Евглевский А.А., ²Чудилова Г.А., ²Ковалева С.В., ²Ломтатидзе Л.В.

¹Российский университет дружбы народов, Москва, Российская Федерация;

²Кубанский государственный медицинский университет, Краснодар, Россия

В течение последних 20 лет значительно расширены представления о роли нейтрофильных гранулоцитов (НГ) в реализации врожденного и адаптивного иммунитета в условиях нормы и патологии. Ранее полагали, что НГ, являясь клетками врожденной иммунной системы способны уничтожать бактерии, вирусы, грибы посредством реализации своей фагоцитарной функции. В настоящее время убедительно показано, что эти клетки способны к синтезу белков *de novo*, т.е. обладают белок-синтетической функцией, секретируют большое количество гранулярных ферментных и неферментных белков, обладающих антибактериальными и регуляторными свойствами, цитокинов, хемокинов, регуляторных молекул, ростовых факторов. На поверхностной мембране НГ экспрессированы сотни различных молекул – рецепторов, обеспечивающих их связь с микроокружением и другими клетками иммунной системы. НГ пластичны и способны, в зависимости от условий, менять свой фенотип и приобретать новые функции, а также регулировать функции клеток, как врожденной, так и адаптивной иммунной системы, оказывая на них в зависимости от условий как активирующие, так и супрессирующие влияния. НГ участвуют в иммунопатогенезе многих инфекционно-воспалительных, аллергических, аутоиммунных, неопластических заболеваний, обладают мощным микробицидным и цитотоксическим потенциалом и при определенных условиях могут влиять на исход воспалительной реакции. С дефицитом количества НГ и нарушением их функций ассоциированы упорно-рецидивирующие гнойно-воспалительные процессы, нейтропеническая форма сепсиса, генерализованный кандидоз и, с

другой стороны, при гиперактивации НГ возникают повреждения клеток и тканей [1,5,10-13].

В настоящее время продемонстрировано, что в борьбе с патогенами НГ осуществляют свою бактерицидную функцию несколькими способами. Первым из них является, открытый еще И.И. Мечниковым [2] фагоцитоз, другим значимым элементом защиты от патогенов является трансмембранная дегрануляция, обеспечивающая выброс микробицидных компонентов цитоплазмы НГ, экстрацеллюлярных везикул во внеклеточную среду и, наконец, открытая, сравнительно недавно, способность НГ к образованию нейтрофильных экстрацеллюлярных сетей (NET), которые представляют собой экстрацеллюлярные сетеподобные структуры, состоящие из «выстреливших» из ядер и митохондрий НГ нитей нуклеиновых кислот - ДНК и «залипших» в них ферментов, неферментных бактерицидных белков, секретируемых НГ в ответ на микробные и немикробные стимулы [2,3,5-10]. Изучению образования NET и факторам, стимулирующих выброс ДНК НГ во внешнюю среду, посвящено достаточно множество работ [1,4,10]. В тоже время особенности формирования NET при повреждении тканей в условиях естественного инфицирования ран и развитии различных фаз воспалительной реакции остаются совершенно неизученными.

Весьма актуальной проблемой является вторичное инфицирование ран, возникающее в хирургических отделениях. Показано, в процессе функционирования хирургических отделений, постепенно формируется уникальный бактериальный «пейзаж», который при

неблагоприятных условиях может влиять на течение гнойно-воспалительных процессов у пациентов, и даже являться причиной внутрибольничных инфекций. В этой связи оценка функциональной активности НГ непосредственно в ране, представляется весьма актуальной, а изучение динамики формирования NET - возникновения, максимальной активности и регрессии, позволило бы более детально следить за развитием фаз гнойно-воспалительного процесса и прогнозировать его исход. Полноценная диагностика количественных и функциональных нарушений НГ и, в частности, диагностика особенностей формирования NET, необходима также для разработки новых подходов к проведению корректной локальной и системной иммунотерапии.

Целью данного исследования явилось изучение динамики возникновения, формирования и регрессии нейтрофильных экстрацеллюлярных сетей в экспериментальной модели раны мягких тканей лабораторных крыс в условиях естественного инфицирования микрофлорой окружающей среды.

Материал и методы. Настоящее экспериментальное исследование проведено на модели раневого воспалительного процесса, сформировавшегося на фоне естественного инфицирования микрофлорой окружающей среды. В эксперименте были использованы 30 беспородных крыс-самцов, у которых под местным обезболиванием (0,25% раствор новокаина) была создана модель открытой раны мягких тканей спины, размерами 2 x 3 см. Раны были подвержены естественному инфицированию микробной флорой, присутствующей в воздушной среде вивария. Для оценки динамики формирования NET в процессе развития инфекционно-воспалительного раневого процесса проводили забор раневого экссудата на 2, 4, 7 и 14 сутки от начала эксперимента. Дизайн эксперимента соответствовал Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или иных научных целей (ETS N 123) (Страсбург, 18.03.1986 г.).

Слайды с отпечатками раневого экссудата окрашивали, применяя разработанный нами метод идентификации NET, основанный на модифицированном нами выявлении ДНК [6]. Изучение слайдов с отпечатками раневого экссудата проводили в световом микроскопе с использованием апохроматических систем при общем увеличении 600х (рис. 1).

Подсчитывали количество зрелых НГ, имеющих сегментированное ядро и количество НГ, сформировавшихся NET, в 10 произвольно выбранных полях зрения микроскопа. Общее число НГ, регистрируемых в поле зрения микроскопа, рассчитывали как сумму НГ и NET (НГ+NET). Динамику числа NET определяли, как процентное отношение числа NET к общему числу НГ. Полученные данные обрабатывали методом вари-

ционной статистики с использованием компьютерной программы StatSoft Statistica 6.0.

Результаты и их обсуждение. После формирования открытой раны спины у крыс-самцов, рана оставалась открытой на протяжении 14 дней и не подвергалась воздействию антисептиков и других лекарственных препаратов. Контроль за течением раневого процесса с параллельной оценкой количества NET в ране проводили на 2, 4, 7 и 14 сутки. Визуально выраженность воспалительной реакции в ранах (гиперемия, отек, гной) отмечалась на 2 и 4 сутки, на 7 сутки наблюдалась выраженная тенденция к очищению раны и стихание воспалительного процесса. К 14 суткам наступало почти полное естественное заживление раны. Среднее количество НГ и NET в отпечатках экссудата раневой поверхности на 2, 4, 7 и 14 сутки от начала эксперимента составило $165 \pm 11,4$; 146 ± 13 ; $14 \pm 0,4$; $4 \pm 0,4$ и $19,8 \pm 1,3$; $36,5 \pm 1,9$; $2 \pm 0,05$; 0 , соответственно, в расчете на одно поле зрения. При этом процентное отношение числа NET к общему числу зрелых НГ соответственно равнялось 10,7%, 20,1%, 12,5%, 0% в расчете на одно поле зрения (рис. 2, 3).

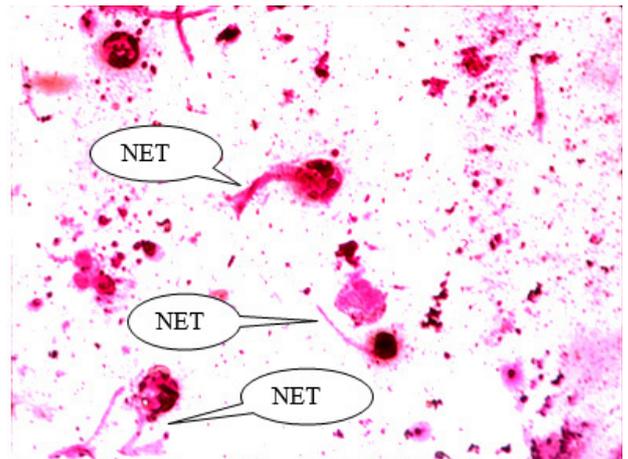


Рис. 1. Типичная картина NET в отпечатках экссудата, увеличение 600х (фрагмент)

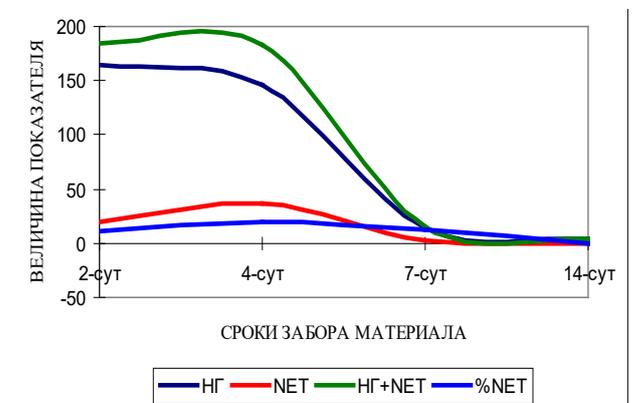


Рис. 2. Динамика показателей зрелых НГ и NET в условиях течения воспалительного процесса при естественном инфицировании экспериментальной раны мягких тканей

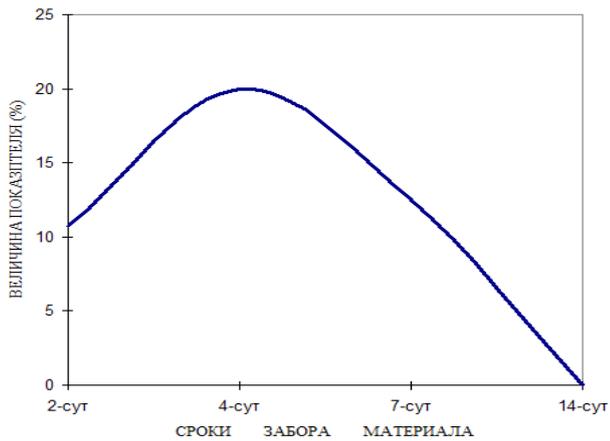


Рис. 3. Динамика % NET в условиях течения воспалительного процесса при естественном инфицировании экспериментальной раны мягких тканей

Следует отметить, что средние количества НГ экссудата, зарегистрированные в одном поле зрения на 2 и 4 сутки эксперимента, достоверно не различались между собой ($p > 0,05$). В то время, как различие в числе NET, зарегистрированное в те же сроки, было статистически значимо ($p < 0,001$). Изменение числа НГ и NET экссудата зарегистрированное на 7 и 14 сутки эксперимента также достоверно различались между собой ($p < 0,001$).

Таким образом, уже на вторые сутки от начала эксперимента при естественном инфицировании раны мягких тканей значительное количество зрелых НГ проявляют способность к образованию NET, которая достигает своего максимума к 4 суткам от начала эксперимента после чего закономерно снижается параллельно с уменьшением числа НГ в экссудате. Полученные данные также свидетельствуют о том, что уже на 2 сутки от начала эксперимента происходит существенное инфицирование экспериментальной раны бактериальной флорой, присутствующей в окружающей среде, что следует учитывать в клинической практике и что может приводить к возникновению «суперинфекции».

Выводы.

1. Продемонстрирована динамика возникновения и регрессии NET в экспериментальной модели раневого инфекционно-воспалительного процесса, который был вызван естественным инфицированием открытой раны микробной флорой окружающей среды.
2. Установлено, что на 2 сутки от начала эксперимента значительное количество зрелых НГ в открытой ране проявляет способность к образованию NET, количество которых достигает своего максимума к 4 суткам от начала эксперимента, что совпадает с максималь-

ными проявлениями инфекционно-воспалительного процесса в ране.

3. Регрессия воспалительных изменений в ране ассоциирована со значительным уменьшением количества NET в раневом отделяемом к 7 суткам и полной регрессией NET к 14 суткам эксперимента на фоне полного заживления раны.

ЛИТЕРАТУРА

1. Долгушин И.И., Андреева А.Ю. Нейтрофильные внеклеточные ловушки и методы оценки функционального статуса нейтрофилов. М. Изд-во РАМН 2009; 208.
2. Мечников И.И. Невосприимчивость в инфекционных болезнях. М., 1947; 167.
3. Нестерова И.В., Колесникова Н.В., Чудилова Г.А., Ломтатидзе Л.В., Ковалева С.В., Евглевский А.А. Нейтрофильные гранулоциты: новый взгляд на «старых игроков» на иммунологическом поле. Иммунология 2015; 4; 257-265.
4. Нестерова И. В. Нейтрофильные экстрацеллюлярные сети: протекция и защита. Intern. J. Immunorehabilitation 2009; 11(1); 25 – 26.
5. Нестерова И.В., Ковалёва С.В., Чудилова Г.А., Коков Е.А., Ломтатидзе Л.В., Сторожук С.В., Уваров И.Б., Казанцева М.В. Особенности фенотипа нейтрофильных гранулоцитов при неопластических процессах. Российский иммунологический журнал 2010; 4(13) № 4; 374 - 380.
6. Нестерова И.В., Чудилова Г.А., Ковалева С.В., Ломтатидзе Л.В., Колесникова Н.В., Евглевский А.А. Методы комплексной оценки функциональной активности нейтрофильных гранулоцитов в норме и патологии. Методические рекомендации. Краснодар 2017; 50.
7. Сепиашвили Р.И. Физиология иммунной системы. М.: Медицина-Здоровье 2015; 352.
8. Сепиашвили Р.И., Бережная Н.М. Система иммунитета как регулятор тканевого гомеостаза (регенерация, репарация, ремоделирование). Аллергология и иммунология 2015; 1; 127-137.
9. Сепиашвили Р.И., Шубич М.Г., Дорофеева И.В. Открытие фагоцитоза и обоснование фагоцитарной теории в историко-научном освещении. Аллергология и иммунология. Научное издание 2015; 16 (1); 78-83.
10. Borregaard N., Cowland J. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. Blood 1997; 89 (10); 3503-3521.
11. Brinkmann V. et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. Science 2004; 303; 1532-1535.
12. Cassatella M. A. The neutrophil an emerging regulator of inflammatory and immune response. Chem. Immunol. Allergy 2003; 83; 232.
13. Zhang D. et al. Neutrophil ageing is regulated by the microbiome. Nature. 2015; V. 525(7570): 528-532.

SUMMARY

DYNAMICS OF OCCURRENCE AND REGRESSION OF NEUTROPHIL EXTRACELLULAR TRAPS IN THE EXPERIMENTAL MODEL OF THE WOUND INFECTIOUS-INFLAMMATORY PROCESS

¹Nesterova I., ²Evglevsky A., ²Chudilova G.,
²Kovaleva S., ²Lomtadidze L.

¹The Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russia; ²Kuban State Medical University, Krasnodar, Russia

The dynamics of the appearance and regression of neutrophilic extracellular traps (NETs) in the experimental model of the wound infectious-inflammatory process that was caused by infection of open wounds by microbes surrounding environment, was studied. It was established that on the second day from the start of the experiment a significant number of mature neutrophilic granulocytes show the ability to form NETs. The number of NETs was reached its maximum by the 2nd and 4th days from the beginning of the experiment, that was associated with maximum occurrence of symptoms of inflammation in the wound. The regression of the wound inflammatory process was associated with decreasing of the number of NETs to 7th day and the complete disappearance of NETs to 14th day of the experiment, which coincided with the healing of wounds.

Keywords: neutrophilic granulocyte, neutrophilic extracellular traps.

РЕЗЮМЕ

ДИНАМИКА ВОЗНИКНОВЕНИЯ И РЕГРЕССИИ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ЭКСТРАЦЕЛЛЮЛЯРНЫХ СЕТЕЙ В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ РАНЕВОГО ИНФЕКЦИОННО-ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ПРОЦЕССА

¹Нестерова И.В., ²Евглевский А.А., ²Чудилова Г.А.,
²Ковалева С.В., ²Ломтатидзе Л.В.

¹Российский университет дружбы народов, Москва, Российская Федерация; ²Кубанский государственный медицинский университет, Краснодар, Россия

Изучена динамика возникновения и регрессии нейтрофильных экстрацеллюлярных сетей (NET) в экспериментальной модели раневого инфекционно-воспалительного процесса, который был вызван естественным инфицированием микробной флоры окружающей среды.

Установлено, что на 2 сутки от начала эксперимента значительное количество зрелых нейтрофильных гранулоцитов в открытой ране проявляют способность к образованию NET, количество которых достигает своего максимума к 4 суткам от начала эксперимента, что совпадает с максимальными проявлениями воспалительного инфекционно-воспалительного процесса в ране. Регрессия воспалительных изменений в ране была ассоциирована со значительным уменьшением количества NET в раневом отделяемом к 7 суткам, и регрессией NET к 14 суткам эксперимента на фоне полного заживления раны.

რეზიუმე

ნეიტროფილური ექსტრაცელულური ქსელების წარმოქმნისა და რეგრესიის დინამიკა ინფექციურ-ანთებითი ჭრილობის ექსპერიმენტულ მოდელში

¹ი. ნესტეროვა ²ა. ევგლევსკი,
²გ. ჩუდილოვა, ²ს. კოვალევა, ²ლ. ლომთათიძე

¹რუსეთის ხალხთა მეგობრობის უნივერსიტეტი, მოსკოვი; ²ყუბანის სახელმწიფო სამედიცინო უნივერსიტეტი, კრასნოდარი, რუსეთი

გარემოს მიკროფლორით ბუნებრივი დაინფიცირებით გამოწვეული ინფექციურ-ანთებითი ჭრილობის ექსპერიმენტულ მოდელზე შესწავლილია ნეიტროფილური ექსტრაცელულური ქსელის წარმოქმნისა და რეგრესიის დინამიკა.

ნაჩვენებია, რომ ექსპერიმენტის დაწყებიდან მე-2 დღეს მომწიფებული ნეიტროფილური გრანულოციტების მნიშვნელოვანი ნაწილი ღია ჭრილობაში ავლენს ნეიტროფილური ექსტრაცელულური ქსელების წარმოქმნის უნარს, რომელთა რაოდენობა მაქსიმუმს აღწევს ექსპერიმენტის დაწყებიდან მე-4 დღეს, რაც თანხვედრა ჭრილობაში ინფექციურ-ანთებითი პროცესის მაქსიმალურ გამოვლინებას.

ჭრილობაში ანთებითი ცვლილებების რეგრესიას ასოცირებული იყო ჭრილობიდან გამონადენში ექსტრაცელულური ქსელის მნიშვნელოვან შემცირებასთან მე-7 დღეს და ექსტრაცელულური ქსელის რეგრესიასთან ჭრილობის სრული შეხორცების ფონზე ექსპერიმენტის მე-14 დღეს.

* * *