АННОТАЦИЯ

Важным механизмом реализации иммунного ответа на вирусную инфекцию и опухолевый процесс является апоптоз. В инициации апоптоза и регуляции иммунного ответа принимают участие представители суперсемейства рецептора фактора некроза опухоли. Одним из них является трансмембранный рецептор DR3/LARD. В пределах иммунной системы он экспрессируется на поверхности лейкоцитов периферической крови (преимущественно Т-лимфоцитах), а также в тканях, содержащих лимфоидные элементы (толстый и тонкий кишечник, тимус, селезенка).

В зависимости от степени активации и типа клеток стимуляция DR3/LARD приводит к запуску апоптоза или пролиферации клеток. Продемонстрирована его важная роль в развитии аутоиммунных и воспалительных заболеваний. Показан вклад рецептора DR3/LARD в реализацию иммунного ответа на цитомегаловирусную и поксвирусную инфекции у мышей. Описано 14 вариантов мРНК DR3/LARD, образующихся путем альтернативного сплайсинга. Среди них выделяют 4 мРНК, кодирующие мембранные формы DR3/LARD, и 10 мРНК, соответствующие растворимым формам. Предполагается, что растворимые формы DR3/LARD (sDR3/sLARD) ингибируют апоптоз, инициированный с помощью мембранных форм рецептора. Функциональная роль растворимого DR3/LARD в настоящее время изучена слабо.

Целью работы явилась разработка и апробация подхода по определению сывороточного уровня суммарного растворимого DR3/LARD и оценка информативности данного показателя при заболеваниях разного генеза.

В связи с этим были поставлены следующие задачи:

Разработать способ оценки сывороточного уровня суммарного растворимого DR3/LARD с помощью иммуноферментного анализа.

Определить сывороточный уровень растворимого DR3/LARD у здоровых волонтеров.

Оценить сывороточные уровни растворимого DR3/LARD у пациентов с герпесвирусной инфекцией и больных раком толстой кишки.

В работе использована сыворотка крови102 пациентов с герпесвирусной инфекцией, поступивших на лечение в Городскую инфекционную больницу № 2 г. Нижнего Новгорода. Инфекция, вызванная вирусом ветряной оспы (ВВО), была зарегистрирована у 23 пациентов, вирусом Эпштейна-Барр (ВЭБ) – у 18 больных, цитомегаловирусом (ЦМВ) – у 61 пациента. Также была использована сыворотка крови 21 пациента с диагнозом рак толстой кишки, проходивших лечение в Нижегородском областном онкологическом диспансере. У 11 больных обнаружен рак толстой кишки 2 стадии, у 10 – рак толстой кишки 3 стадии. 15 пациентов имели умереннодифференцированную опухоль, 6 – высокодифференцированную опухоль. В качестве контроля было проанализировано 300 образцов сыворотки крови здоровых волонтеров, полученных из Нижегородской областной станции переливания крови им. Н.Я. Климовой.

Сывороточный уровень sDR3/sLARD определяли с помощью разработанного авторами иммуноферментного метода. В лунки планшетов для иммуноферментного анализа (ГосНИИ «Медполимер», Москва) вносили по 100 мкл раствора моноклональных антител против рецептора DR3/LARD (МКАантиDR3/LARD) (eBioscience, США) в концентрации 6 мкг/мл и инкубировали планшеты 24 часа при +25о С во влажной камере. Несвязавшиеся антитела пятикратно отмывали ФСРТ, содержащим 0,9 % NaCl, 0,1 % Na2HPO4 и 0,1 % Tween-80. На втором этапе в лунки планшетов вносили по 100 мкл образцов цельной сыворотки крови и инкубировали 24 часа при +25о С во влажной камере. Затем планшеты пятикратно отмывали раствором ФСРТ. После инкубации планшетов с образцами исследуемых сывороток в лунки добавляли по 100 мкл рабочего раствора конъюгированных с пероксидазой корня хрена козьих поликлональных антител (ПКА), полученных иммунизацией животных мононуклеарными клетками периферической крови человека, и инкубировали 1 час при +37о С во влажной камере. Несвязавшийся конъюгат отмывали, как указано выше. Проявляли реакцию, используя свежеприготовленный раствор тетраметилбензидина в 0,05 М цитратном буферном растворе (рН 5,0), содержащем 0,01 % перекиси водорода. Останавливали реакцию 5 %-ным раствором серной кислоты. Учет результатов проводили спектрофотометрически при длинах волн 450 нм и 620 нм.

В качестве контроля фона использовали раствор ФСРТ. В качестве положительного контроля и одновременно стандарта использовали образцы сыворотки крови здоровых волонтеров. Путем последовательного титрования положительного контроля строили калибровочную кривую, которую использовали для оценки относительного содержания sDR3/sLARD в исследуемых образцах, выражаемого в условных единицах на мл сыворотки (U/ml). Сывороточный уровень sDR3/sLARD в стандартном образце принимали за 1000 U/ml.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью пакета программ Statistica v. 8.0 с применением непараметрических критериев Крускала-Уоллиса и Манна-Уитни.

У здоровых волонтеров сывороточный уровень sDR3/sLARD составил 82,5 U/ml (76,2; 94,8). Эти значения в дальнейшем использовались в качестве показателя нормы.

При инфицировании ВВО и ЦМВ сывороточный уровень sDR3/sLARD находился в пределах нормы, составляя 74,4 U/ml (56,6; 121,7) и 96,1 U/ml (66,9; 522,0), соответственно. При ВЭБ-инфекции сывороточный уровень sDR3/sLARD был увеличен до 714,4 U/ml, что превышало показатель нормы в 8,7 раза (583,2; 818,8) (р<0,001). При РТК сывороточный уровень sDR3/sLARD составил 790,0 U/ml (47,5; 894,8) на 2 стадии заболевания и 352,8 U/ml (47,8; 706,8) на 3 стадии. Статистически значимые различия в сравнении со здоровыми волонтерами наблюдались лишь на 2 стадии заболевания (р=0,048). Содержание sDR3/sLARD в сыворотке крови таких больных было в среднем повышено в 9,6 раза.

Присутствие высокодифференцированной опухоли сопровождалось выраженной тенденцией к повышению сывороточного содержания sDR3/sLARD до 443,4 U/ml (47,0; 830,4), однако различия в сравнении с нормой были статистически не значимы. При умереннодифференцированной форме РТК сывороточный уровень sDR3/sLARD составил 664,4 U/ml (496,2; 790,0), что в 8,0 раз превышало норму (р=0,01). Статистически значимых различий в сывороточном содержании sDR3/sLARD между больными с высокодифференцированной и умереннодифференцированной опухолью выявлено не было.

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что растворимый DR3/LARD может участвовать в модуляции иммунного ответа, блокируя инициацию апоптоза и обеспечивая тем самым уход опухолевых и вирус-инфицированных клеток от иммунологического надзора. Определение содержания sDR3/sLARD в сыворотке крови может быть информативным для мониторинга онкологических и вирусных заболеваний.