нова, А.Д. Гащенко, Г.А. Забунян, П.Г. Овсиенко, Ю.Ю. Стфанова, В.Г. Абушкевич // Кубанский научный медицинский вестник. – 2013. – № 5 (140). – С. 152–155.

12. *Трофимов А.Е., Думановская М.Р., Чернуха Г.Е., Бурменская О.В., Донников Д.Ю.* Вероятность неопластической трансформации при различных типах гиперплазии эндометрия. // Акушерство и гинекология. – 2013. – № 8. – С. 56–62.

13. *Унанян А.Л., Сидорова И.С., Коган Е.А., Демура Т.А., Демура С.А.* Активный и неактивный аденомиоз: вопросы патогенеза и патогенетической терапии // Акушерство и гинекология. – 2013. – № 4. – С. 10–13.

14. *Файззулина Т.А., Коган Н.М., Аскольская Е.А., Бурыкина С.И., Демура П.Н., Караваев Т.В. Попов Ю.Е., Булынина Ю.В.* Морфофункциональное состояние эндометрия у больных миомой матки репродуктивного возраста // Акушерство и гинекология 2013. – № 8 – С. 46–51.

15. *Чернуха Г.Е., Думановская М.Р.* Современные представления о гиперплазии эндометрия // Акушерство и гинекология. – 2013. – № 3. – С. 26–32.

16. *Шкляр А.А., Адамян Л.В., Коган Е.А., Парамонова Н.Б., Козаченко И.Ф., Гаврилова Т.Ю., Кононов С.Н.* Трудности диагностики узловой и диффузной форм аденомиоза // Акушерство и гинекология. – 2015. – № 3. – С. 67–72.

Поступила 23.07.2016

Т.В. РУСИНОВА, Г.А. ЧУДИЛОВА, Н.В. КОЛЕСНИКОВА

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ИММУНОТРОПНЫХ ЭФФЕКТОВ IN VITRO ДЕРИНАТА И СИНТЕТИЧЕСКОГО АГОНИСТА TLR9 НА РЕЦЕПТОРНУЮ ФУНКЦИЮ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ И МОНОЦИТОВ В НОРМЕ И ПРИ ИНФЕКЦИОННОМ ПРОЦЕССЕ

Центральная научно-исследовательская лаборатория,
ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» МЗ РФ
Россия, 350063, г. Краснодар, ул. Седина, 4. Тел. 8 (961) 52-83-446. E-mail: rusinova.tv@mail.ru

Проведена сравнительная оценка характера экспрессии рецепторов TLR9 и CD11b нейтрофильными гранулоцитами и моноцитами цельной крови под действием дерината и синтетического лиганда TLR9 у здоровых лиц и при острых инфекционных заболеваниях вирусной и бактериальной природы. Показано, что однонаправленные эффекты исследуемых препаратов касаются изменения количества нейтрофильных гранулоцитов, несущих TLR9, и величины MFI CD289 во всех исследуемых группах, а для моноцитов только при инфекционном процессе. Разнонаправленные эффекты выявлены в отношении характера экспрессии молекул CD11b моноцитами во всех группах, а также нейтрофилами в группе здорового контроля.

Ключевые слова: деринат, агонист TLR-9, нейтрофильные гранулоциты, моноциты.

T.V. RUSINOVA, G.A. CHUDILOVA, N.V. KOLESNIKOVA

COMPARATIVE ANALYSIS IMMUNOTROPIC EFFECTS IN VITRO DERINAT AND SYNTHETIC TLR9 AGONIST ON RECEPTOR FUNCTION OF NEUTROPHILIC GRANULOCYTES AND MONOCYTES IN NORMAL AND INFECTIOUS PROCESS

Central Research Laboratory, Kuban state medical university,
Russia, 350063, Krasnodar, Sedina str., 4. Tel. 8 (961) 52-83-446. E-mail: rusinova.tv@mail.ru

Comparative evaluation of character of the expression of TLR9 and CD11b receptors by neutrophilic granulocytes and monocytes whole blood under the influence of Derinat and synthetic TLR9 ligand in healthy individuals and in acute infectious diseases of viral and bacterial origin has been studied. It has been shown that the unidirectional effects of study drugs relate changes in the number of neutrophils, carrying TLR9, and MFI CD289 in all groups, and monocytes only in groups with infectious process. Differently directed effects identified in relation to expression of molecules CD11b monocytes in all groups, and neutrophils in a group of healthy controls.

Key words: derinat, agonist TLR9, neutrophilic granulocytes, monocytes.

Введение

Механизмы взаимодействия патоген-ассоциированных молекул (PAMP) с паттерн-распознающими рецепторами (PRR) в последнее время привлекают пристальное внимание исследователей во всем мире. Особый интерес представляют *Toll*-подобные рецепторы, данные белки способны распознавать консервативные структуры микроорганизмов и в дальнейшем активируют клеточный иммунный ответ. При инвазии бактериальной или

вирусной ДНК распознавание обеспечивается рецепторами TLR9, которые преимущественно локализованы внутриклеточно (эндосомально), но могут иметь и поверхностную локализацию. Лигандами для TLR9 (CD289) являются неметилированные CpG мотивы ДНК, данные рецепторы экспрессируются моноцитами (макрофагами), плазмоцитоидными дендритными клетками, В-лимфоцитами и нейтрофильными гранулоцитами [1, 4].

Неметилированные CpG-фрагменты распространены в ДНК прокариот и вирусной ДНК, геном позвоночных содержит небольшое количество подобных потенциальных иммуностимуляторных CpG-мотивов, однако известно, что распознавание аутоДНК также обеспечивают TLR9, но о точных механизмах распознавания фрагментов ДНК эукариотических клеток известно мало [2].

В связи с вышеизложенным нами были проведены исследования влияния лекарственного препарата животного происхождения «Деринат» (натриевая соль ДНК молок лососевых рыб) на рецепторную оснащённость TLR9 на нейтрофильных гранулоцитах (НГ) и моноцитах (МОН), а также сравнительная оценка влияния препарата «Деринат» и коммерческого агониста (лиганда) рецептора TLR9 – ODN2395. По данным литературы известно, что распознавание TLR9-патогенов происходит в кооперации с другими рецепторами, в частности с CD11b. Отмечена корреляционная связь однонаправленной активации CD11b и TLR9 даже при низком уровне воздействия патогена [3]. В связи с чем изучение поверхностных рецепторов CD11b на CD16+НГ и сравнительная оценка влияния на них дерината и агониста TLR9 – ODN2395 может служить косвенным доказательством активации TLR9 при воздействии деринатом.

Цель исследования – провести сравнительную оценку характера экспрессии TLR9 и CD11b иммунокомпетентными клетками (НГ, МОН) под действием дерината и агониста TLR9 у здоровых лиц и при острых инфекционных заболеваниях вирусной и бактериальной природы.

Материалы и методы

Проведено обследование 28 взрослых пациентов с острым инфекционным мононуклеозом, ассоциированным с Эпштейн-Барр-вирусной инфекцией (ОВЭБИ) и 25 больных с острым бактериальным тонзиллитом (ОБТ). Контрольную группу составили 25 практически здоровых лиц.

Цельную кровь здоровых добровольцев и пациентов инкубировали 1 час с синтетическим агонистом TLR9 – ODN2395 («Invitrogen» LifeTechnologies, США), и деринатом («Техномедсервис», Россия) при температуре 37°С.

Программа иммунологического исследования включала изучение плотности экспрессии молекул, CD14, CD16, CD289. Особенности экспрессии TLR9, CD16 нейтрофильными гранулоцитами и TLR9, CD14 моноцитами определяли методом проточной лазерной цитометрии (CYTOMICSFC500, BeckmanCoulter, США) с использованием моноклональных антител CD289 (TLR9) PE; CD16 – FITC, CD14 – FITC. Оценка уровня плотности экспрессируемых молекул проводилась по показателю интенсивности флуоресценции (MFI). Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью компьютерных программ Microsoft Exel, StatPlus 2009 с применением непараметрических тестов Вилкоксона. Результаты представляли как медиану с верхним и нижним квартилем ($Me(Q_1\text{-}Q_3)$). Различия определяли значимыми при $p < 0{,}05$, незначимыми – при $p > 0{,}10$; в промежуточных случаях ($0{,}05 < p \leq 0{,}10$) обнаруженные эффекты обсуждали как тенденции.

Результаты и обсуждение

При анализе результатов исследования внутриклеточной экспрессии TLR9 нейтрофилами периферической крови выявлено, что у больных острым бактериальным тонзиллитом (ОБТ) процентное содержание НГ, экспрессирующих внутриклеточно CD289 ($CD16^+CD289^+$НГ), так же как и плотность экспрессии TLR9 (MFI-CD289), было достоверно выше ($p<0{,}01$), по сравнению с группой контроля, что можно расценивать как адекватный ответ на бактериальные патогены. В группе с острой вирусной инфекцией значения данных показателей были достоверно ниже, чем в контрольной группе (таблица 1).

У здоровых лиц деринат и агонист TLR9 in vitro достоверно усиливал (в 2,5 раза) плотность внутриклеточной экспрессии TLR9 ($p<0{,}05$), но процентное содержание клеток, несущих рецептор CD289, не изменилось, что может свидетельствовать об активации клетки и подготовке к продукции цитокинов [5, 6]. Между тем у больных ОБТ исходно повышенное содержание TLR9(+)-НГ с высокой плотностью экспрессии данного рецептора, инкубация клеток с деринатом в условиях in vitro приводит к нормализации показателя, что свидетельствует об иммуномодулирующем действии дерината, направленном на контроль воспалительной реакции при инфекционном процессе. Сходные

Таблица 1

Экспрессия TLR9 и CD11b нейтрофильными гранулоцитами в норме и при инфекционных заболеваниях вирусной и бактериальной природы

Группа	$CD16^+CD289^+$НГ	MFI-CD289	$CD16^+CD11b^+$НГ	MFI-CD11b
Здоровые				
Интактная ЦК	32,6 (22,3-36,5)	4,37 (3,98-4,85)	99,0 (98,4-99,5)	15,3 (13,7-23,25)
Инкубация ЦК с деринатом	33,98 (34,5-38,97)	11,32 (9,36-15,6)*	97,9 (96,33-99,19)	63,4 (57,7-79,1)*
Инкубация ЦК с ODN2395	31,57 (30-34,21)	10,36 (9,5-14,39)*	98,8 (97,8-99,28)	26,3 (23,25-27,85)*
ОБТ				
Интактная ЦК	43,6 (41,23-56,54)^	11,74 (10,27-13,6)^	97 (92,83-98,95)	32 (21,37-38,83)^
Инкубация ЦК с деринатом	30,28 (27,34-34,8)*	7,63 (6,12-9,19)	96,4 (86,45-98,6)	21,3 (16,6-26,2)*^
Инкубация ЦК с ODN2395	31,9 (27,45-36,24)*	9,3 (9,07-11,24)	97,47 (88,1-98,9)	21,4 (16,07-34,67)*
ОВЭБИ				
Интактная ЦК	24,06 (8,89-39,6)^	4,2 (2,45-5,97)	86,3 (76,23-98,4)	33,6 (22,3-38,8)^
Инкубация ЦК с деринатом	22,3 (9,64-35,26)^	3,56(2,88-4,25)^	82,32 (76,6-96,66)	19,7 (13,1-22,7)*
Инкубация ЦК с ODN2395	21,36 (10,6-33,54)^	4,15 (3,18-8,14)^	80,9 (74,4-94,86)^	19,2 (18,7-20,4)*

Примечание: *– достоверность отличий от контроля; ^ – достоверность отличий от исходных данных; ОБТ – пациенты с острым бактериальным тонзиллитом; ОВЭБИ – пациенты с острой ВЭБ-инфекцией; ЦК – цельная кровь.

иммуномодулирующие эффекты дерината были обнаружены и в случае внутриклеточной экспрессии TLR9, однако выраженность иммунотропных эффектов была меньшей – без достижения контрольного уровня.

Обращает на себя внимание тот факт, что инкубация НГ пациентов с ОВЭБИ с деринатом в системе in vitro не позволила выявить его иммунотропных эффектов в отношении TLR9, что может быть связано с дефектом передачи активирующего сигнала в клетку или со сниженим функциональных возможностей НГ вследствие высокой вирусной нагрузки in vivo при данной патологии.

При оценке экспрессии CD11b на поверхности нейтрофильных гранулоцитов выявлено, что деринат достоверно изменяет интенсивность его флуоресценции, причём у здоровых лиц показатель MFI значительно увеличивается (в 4,1 раза), у больных ОБТ и ОВЭБИ достоверно уменьшается (в 1,5 раза). Важно подчеркнуть, что при инфекционном процессе агонист рецептора TLR9 оказывает эффект, сходный с действием дерината, тогда как в контрольной группе величина MFI остаётся неизменной.

Результаты исследования внутриклеточной и поверхностной экспрессии молекул TLR9 и CD11b моноцитами периферической крови в исследуемых группах представлены в таблице 2. Показано, что содержание моноцитов, экспрессирующих поверхностно CD14+ и внутриклеточно – CD289+, у здоровых лиц достоверно выше, чем у больных ОБТ и ОВЭБИ. Однако величина MFI-CD289 только у больных ОВЭБИ оказывается достоверно выше контрольных значений (в 3,8 раза), а при острой бактериальной инфекции изменений показателя не наблюдается (таблица 2).

Исследованиями показано, что деринат в системе in vitro вызывает усиление экспрессии CD289 у здоровых лиц, что приводит к возрастанию содержания моноцитов, экспрессирующих TLR9, в 2 раза относительно исходного уровня, а инкубация цельной крови здоровых лиц с агонистом TLR9 – ODN2395, напротив, в 2,8 раза снижает количество CD289+-МОН. Отмечено, что в клинических группах эффекты как дерината, так и агониста TLR9 имеют однонаправленный характер в виде снижения содержания моноцитов, внутриклеточно экспрессирующих CD289. Наряду с этим только при ОВЭБИ выявлена способность дерината и агониста TLR9 значительно снижать плотность экспрессии TLR9 (в 4 и 3,1 раза соответственно).

При изучении характера экспрессии CD11b на поверхностной мембране CD14(+)-моноцитов периферической крови здоровых лиц, а также па-

Таблица 2

Экспрессия TLR9 и CD11b моноцитами в норме и при инфекционных заболеваниях вирусной и бактериальной природы

Группа	$CD14^+CD289^+$МОН	MFI-CD289	$CD14^+CD11b^+$МОН	MFI-CD11b
Здоровые				
Интактная ЦК	40,4 (31,26-84,37)	4,09 (3,93-11,03)	99,6 (97,8-99,9)	23,3 (5,15-26,15)
Инкубация ЦК с деринатом	80,7 (80,3-95,95)*	7,27 (6-10,29)	99,8 (99,7-100)	34,65 (18,05-62,3)*
Инкубация ЦК с ODN2395	14,61 (11,09-70,9)*	9,02 (7,19-18,8)*	98,9 (88,9-99,97)	24,5 (10,96-25,94)
ОБТ				
Интактная ЦК	20,2 (9,29-47,01)^	3,88 (3,81-5,33)	97 (92,83-98,95)	32,0 (21,38-38,83)
Инкубация ЦК с деринатом	4,17 (2,26-78,18)*^	4,67 (3,54-15,48)	96,4 (86,45-98,63)	21,35 (16,6-26,25)*^
Инкубация ЦК с ODN2395	5,76 (2,9-29,9)*^	3,4 (3,24-5,73)	99,3 (98,7-99,41)	32,6 (21,8-40,9)
ОВЭБИ				
Интактная ЦК	17,69 (5-22,2)	15,5 (4,06-34,3)^	86,3 (76,23-98,4)	33,6 (22,3-38,8)
Инкубация ЦК с деринатом	3,9 (1-4,6)*^	3,84 (3,15-19)*	83,32 (76,6-96,66)^	19,7 (13,1-22,5)*
Инкубация ЦК с ODN2395	2,11 (1-6,62)*^	4,91 (4,36-21,7)*	90,3 (80-97,71)	34 (20,9-37,9)

Примечание: *– достоверность отличий от контроля; ^ – достоверность отличий от исходных данных; ОБТ – пациенты с острым бактериальным тонзиллитом; ОВЭБИ – пациенты с острой ВЭБ-инфекцией; ЦК – цельная кровь.

циентов с вирусной и бактериальной инфекцией было выявлено сходство такового с экспрессией данного рецептора на CD16(+)-НГ. Так процентное содержание моноцитов, несущих CD11b, достоверно не изменяется в условиях инкубации клеток с деринатом и с ODN2395. Также выявлено, что деринат in vitro достоверно увеличивает MFI-CD11b у здоровых лиц (в 1,5 раза) и уменьшает величину данного показателя при ОБТ (в 1,5 раза) и ОВЭБИ (в 1,7 раза). Интерес представляет тот факт, что в присутствии коммерческого агониста рецептора TLR9 значения MFI CD11b оставались на исходном уровне во всех группах обследуемых.

Таким образом, сравнительная оценка характера экспрессии TLR9 и функционально значимого рецептора НГ и МОН – CD11b у здоровых лиц и у больных острой бактериальной и вирусной инфекцией в условиях культивирования цельной крови с деринатом и синтетическим лигангдом рецептора TLR9 продемонстрировала как сходные по направленности, так и разнонаправленные эффекты. При этом однонаправленные эффекты исследуемых препаратов касаются количества НГ, несущих TLR9 во всех исследуемых группах и моноцитов при инфекционном процессе, а разнонаправленные связаны с уровнем экспрессии поверхностных молекул CD11b нейтрофильными гранулоцитами в группе здорового контроля. В то время как агонист TLR9 не влияет на MFI-CD11b на мембране МОН, а деринат оказывает статистически значимое влияние на плотность его экспрессии.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Абатуров А.Е., Волосовец А.П., Юлиш Е.И.* Роль Toll-подобных рецепторов в рекогниции патоген-ассоциированных молекулярных структур инфекционных патогенных агентов и развитии воспаления. Часть 1. Семейство TLR // Здоровье ребёнка. – 2012. – № 5(40). – С. 116–121.
2. *Федянина Л.Н.* Влияние дезоксирибонуклеиновой кислоты из молок лососевых рыб на секрецию цитокинов клетками крови здоровых доноров // Мед. иммунол. – 2005. – Т. 7. № 5–6. – С. 617–619.
3. *Figueiredo M.M., Amorim I. FG., Pinto A. JW. et al.* Expression of Toll-like receptors 2 and 9 in cells of dog jejunum and colon naturally infected with Leishmania infantum // BMC Immunol. – 2013. – 14 (22). doi: 10.1186/1471-2172-14-22
4. *Lindau D., Musserd J., Wagner B.J.* Primary blood neutrophils a functional cell surface Toll-like receptor 9 // Europ. J. of Immunology. – 2013. – V. 43(8). – P. 2101–2113.
5. *Mangan, P.R., Harrington L.E., O'Quinn D.B.* et al. Transforming growth factor β induces development of the TH17 lineage // Nature. – 2006. – V. 441. – P. 231–234.
6. *Veldhoen M., HockingR.J., Atkins C.J. et al.* GF in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells // Immunity. – 2006. – V. 24. – P. 179–189.

Поступила 11.07.2016