

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

**Государственное учреждение «Республиканский
научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии»**

**СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ
ИНФЕКЦИОННОЙ ПАТОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА**

Сборник научных трудов

выпуск 7

Минск

2014

*Сборник научных трудов
Основан в 2008 г.*

Редакционная коллегия:

Т.В. Амвросьева, д-р мед. наук, проф.
(зам. главного редактора),
Е.И. Бореко, д-р мед. наук, доц.
(зам. главного редактора),
В.А. Горбунов, канд. мед. наук, доц.,
В.Ф. Ерёмин, д-р мед. наук, доц.,
И.И. Кучеров, д-р мед. наук,
Н.П. Мишаева, д-р биол. наук, доц.,
Н.Н. Полещук, д-р мед. наук, проф.,
Т.И. Самойлова, д-р биол. наук, доц.,
Е.О. Самойлович, д-р мед. наук, доц.,
Л.В. Скрипова, д-р биол. наук, проф.,
М.Е. Хмара, д-р мед. наук,
Г.Н. Чистенко, д-р мед. наук, проф.

Редакционный совет:

А.Н. Алексеев, д-р мед. наук, проф. (Россия),
Л. ДуБуски, проф. (США),
Н.А. Виноград, д-р мед. наук, проф. (Украина),
С.В. Жаворонок, д-р мед. наук, проф. (Беларусь),
И.А. Карпов, д-р мед. наук, проф. (Беларусь),
А.Ю. Миронов, д-р мед. наук, проф. (Россия),
М. Муровска, д-р мед. наук, проф. (Латвия),
Н.В. Рудаков, д-р мед. наук, проф. (Россия),
В.М. Семенов, д-р мед. наук, проф. (Беларусь),
Дж. Сильва, проф. (США),
А.В. Сукало, чл.-корр. НАН Беларуси, д-р мед. наук,
проф. (Беларусь),
Д. Феби, проф. (Великобритания),
М.В. Цыркунов, д-р мед. наук, проф. (Беларусь)

Рецензенты:

чл.-корр. НАН Беларуси, д-р биол. наук Э.И. Коломиец
д-р мед. наук, профессор Н.Д. Коломиец

Под редакцией:

чл.-корр. НАН Беларуси, д-ра мед. наук, проф. Л.П. Титова

Современные проблемы инфекционной патологии человека: сб. науч. тр. / М-во здравоохран. Респ. Беларусь. РНПЦ эпидемиологии и микробиологии; под ред. Л.П. Титова. — Минск: ГУ РНМБ, 2014. — Вып. 7. — 326 с., 95 ил., 78 табл.

В сборнике представлены результаты исследований сотрудников РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, специалистов в области инфекционной патологии ряда ведущих научно-практических учреждений Республики Беларусь, стран СНГ и дальнего зарубежья. В публикациях отражены актуальные вопросы эпидемиологического надзора и молекулярной эпидемиологии, молекулярно-генетических и клеточных механизмов патогенеза, современных проблем иммунопрофилактики, диагностики и лечения инфекционных заболеваний.

Сборник предназначен для научных сотрудников и работников практических учреждений системы здравоохранения.

The collection contains the research results obtained by specialists of the Republican Research & Practical Center for Epidemiology & Microbiology, by experts in the field of infectious pathology from leading research medical institutions of the Republic of Belarus, the CIS and abroad. Topical issues of epidemiological surveillance and molecular epidemiology, molecular genetic and cellular mechanisms of pathogenesis, contemporary issues for immunization, diagnosis and treatment of infectious diseases are reflected in the papers.

The book is intended for researchers and specialists in public health.

УДК 616.9(066)(045)
ББК Р.25.2.0.1

© Составление. ГУ РНПЦЭМ, 2014.
© Оформление. ГУ «Республиканская
научная медицинская библиотека», 2014.

Regional infectious clinical hospital, their data compared with the group of healthy children. Markers of the most common opportunistic infections in HIV-infected children were identified. In HIV-infected children EBV DNA (43%) were significantly more common compared with a group of healthy children (26%, $p = 0.008$). In the group of healthy children CMV IgG was significantly more prevalent (50 vs. 12% in HIV-infected, $p = 0.02$). HSV1/2 DNA in the study groups of children could not be detected. Also in children have not been identified IgM TOX, CMV, HSV1/2.

Keywords: HIV infection, children, opportunistic infections.

Поступила 19.06.2014

ОЦЕНКА СТАБИЛЬНОСТИ ГЕНЕТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ЭКТОМЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ОБОНЯТЕЛЬНОГО ЭПИТЕЛИЯ ЧЕЛОВЕКА В ПРОЦЕССЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

Антоневич Н.Г.¹, Гончаров А.Е.¹, Квачева З.Б.², Чекан В.Л.³, Сидоренко И.В.³, Петрова Л.Г.³

¹РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Минск;

²Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск;

³Белорусская государственная медицинская академия последипломного образования, Минск, Беларусь

Реферат. В оптимизированных условиях культивирования эктомезенхимальных стволовых клеток обонятельного эпителия (ЭМСК ОЭ) человека не отмечается повышения риска злокачественной трансформации клеток, связанного с нарушением кариотипа и абберантным метилированием регуляторной области гена-онкосупрессора *RARb*. Полученные результаты свидетельствуют в пользу генетической стабильности культивируемых ЭМСК ОЭ человека и указывают на безопасность их использования в клеточной терапии.

Ключевые слова: эктомезенхимальные стволовые клетки, обонятельный эпителий, культивирование, клеточная терапия человека.

Введение. Как показали многочисленные доклинические испытания, мезенхимальные стволовые клетки (МСК) имеют значительный терапевтический потенциал. Разработка протоколов лечения с применением биомедицинских клеточных продуктов на основе культивируемых МСК в будущем может стать альтернативой или дополнением к традиционным методам в терапии поврежденных кожных покровов, дегенеративных заболеваний нервной системы, аутоиммунных заболеваний и др. [1–4]. Несмотря на достигнутые успехи в области клеточных технологий, по-прежнему остается открытым вопрос безопасности использования МСК, которые с целью накопления биомассы подвергаются длительному культивированию. Одним из рисков применения МСК в клинике является их способность к спонтанной злокачественной трансформации в условиях культуры и приобретение ими опухоле- и онкогенного потенциала [5–7]. Существует две гипотезы относительно того, что является причиной малигнизации МСК. Первая объясняет появление трансформированных клеток в культуре их изначальным присутствием в ткани донора, из которой они получены, и позитивной селекцией таких клеток в процессе культивирования по сравнению с нормальными за счет более высокой пролиферативной активности [8, 9]. Вторая гипотеза указывает на приобретенный характер генетической нестабильности, которую может вызвать ряд внешних факторов: способ выделения МСК, состав применяемых ростовых сред и подложек для адгезии, плотность посева клеток, концентрации кислорода, значения pH и другие параметры. При этом увеличение сроков культивирования и манипуляций, которым подвергаются клетки, повышает вероятность возникновения генетических и эпигенетических дефектов [8]. Одним из наиболее часто наблюдаемых отклонений является изменение нормального числа хромосом (кариотипа) культивируемых клеток: анеуплоидия, полиплоидия. Возникновение хромосомных аномалий является предиктором запуска многостадийного процесса трансформации, одним из этапов которого может быть инактивация генов-онкосупрессоров или амплификация онкогенов. При анализе культур МСК, полученных из различных тканей, довольно часто выявляется анеуплоидия, тем не менее данное явление не всегда сопровождается злокачественным перерождением клеток. С другой стороны, имеются данные, что при

видимости сохранения нормального кариотипа, МСК высоких пассажных уровней, имели многочисленные хромосомные мутации (транслокации и делеции), что также является предпосылкой к малигнизации [10–12]. Несмотря на то, что геномные и хромосомные аномалии, выявляемые у стволовых клеток, не всегда приводят к злокачественной трансформации, прежде чем использовать в клинической практике биомассу МСК, накопленную *in vitro*, необходимо проводить цитогенетический анализ стабильности генома клеток для того чтобы уменьшить риски возникновения посттрансплантационных осложнений у реципиента.

Еще одним важным критерием контроля функциональной стабильности является изучение эпигенетического метилирования ДНК в МСК, характер которого может изменяться под воздействием различных факторов в процессе культивирования. Появление гипо- или гиперметилированных участков (абберантное метилирование) в регуляторных областях некоторых генов (онкосупрессоров, онкогенов) может изменять их экспрессию и являться причиной развития онкологических заболеваний *in vivo* и трансформации *in vitro* [13, 14]. Показано, что перевиваемые культуры, полученные из опухолей человека, сохраняют абберантный тип метилирования и в условиях культивирования. Наиболее часто отмечается гиперметилирование регуляторных областей генов онкосупрессоров (*BRCA1*, *BRCA2*, *CDKN2A*, *RASSF1A*, *RARb*, *SEPT9b*, *IGFBP3*, *CEBPD*, *MGMT*, *DAPK1* и др.), следствием которого является изменение многих процессов в клетках и запуск начальных стадий канцерогенеза [15–18]. В связи с этим оценка эпигенетической стабильности ДНК культивируемых МСК и исключение культур клеток с абберантным метилированием регуляторных областей онкосупрессоров в совокупности с другими критериями может повысить безопасность проведения клеточной терапии.

В настоящее время для решения задач регенеративной медицины применяют широкий спектр тканеспецифичных МСК. Относительно новым и перспективным с терапевтической точки зрения клеточным материалом являются эктомезенхимальные стволовые клетки обонятельного эпителия (ЭМСК ОЭ) человека [19–21]. Ранее нами была оптимизирована технология накопления биомассы ЭМСК ОЭ, достаточной для клеточной терапии [21]. К настоящему моменту относительно полно описаны особенности роста и морфофункциональные свойства ЭМСК ОЭ [22, 23]. Тем не менее, исследования генетической и эпигенетической стабильности ЭМСК ОЭ ранее не осуществлялись. Проводить такие исследования необходимо для оценки онко- и опухолевого потенциала ЭМСК ОЭ и гарантии их безопасности.

Цель работы — оценка стабильности кариотипа и изучение эпигенетического статуса метилирования регуляторной области гена-онкосупрессора *RARb* (ген рецептора ретиноевой кислоты β), культивируемых ЭМСК ОЭ человека.

Материалы и методы.

1. *Получение культур ЭМСК ОЭ, условия культивирования.* Первичные культуры и субкультуры ЭМСК ОЭ человека получали по ранее разработанной технологии [21]. Проводили оценку культур клеток ОЭ на соответствия паспортным данным (морфология — фибробластоподобная; жизнеспособность — не менее 95%; фенотип — не менее 90% CD90⁺, CD105⁺, нестин⁺, CD45⁻, микробиологическая чистота). В экспериментах использовали 8 восстановленных из криоконсервации культур, а также накопленные в присутствии факторов роста (EGF и bFGF) клетки.

2. *Определение иммунофенотипа клеток.* Фенотипирование клеток методом проточной цитометрии проводили по стандартной методике с использованием антител к молекулам CD90 (FITC), CD105 (PE), CD45 (PE-Cy7), нестину (FITC). Флуоресценцию регистрировали на проточном цитофлуориметре «FACSCalibur» (BD Biosciences, США).

3. *Кариотипирование культур ЭМСК ОЭ.* Для получения метафазных пластин культуры ЭМСК ОЭ высевали на флаконы площадью 75 см² в концентрации 5000 кл./см². На 2–3-и сут культивирования, когда наблюдалось максимальное число митозов, за 2 ч до фиксации клеток в культуральную среду вносили раствор колхицина в конечной концентрации 0,5 мкг/мл. Затем клетки отделяли от поверхности флакона раствором 0,125% трипсина в 0,02% ЭДТА. Далее проводили их гипотоническую обработку в 10 мл раствора 0,056 М КСl в течении 20 мин. Клетки отмывали центрифугированием в DPBS и фиксировали в 3 мл смеси метанола и ледяной уксусной кислотой (3:1) на протяжении 10 мин при –20°C. Центрифугировали, осадок снова ресуспендировали в 3 мл фиксирующей смеси и оставляли на 30 мин при –20°C. Центрифугировали пробирки с клетками, фиксирован-

ные клетки ресуспензировали в 0,5 мл 96° этанола. Полученную суспензию раскапывали на охлажденные влажные стекла. Хромосомы окрашивали раствором безбензида с концентрацией 0,01 мкг/мл в течение 15 мин в темноте, промывали стекла дистиллированной водой. Препараты анализировали на флуоресцентном микроскопе Nikon TE2000-E ($\times 1000$) с применением полосового фильтра 470/20 нм, подсчитывая для каждой культуры 50–100 метафазных пластин. Анализировали распределение клеток по числу хромосом.

4. *Оценка статуса метилирования регуляторной области гена RARB.* Выделение ДНК из клеточных культур проводили с использованием TriReagent согласно рекомендациям производителя. Осуществляли гидролиз 5 мкг ДНК при помощи 100 ед. акт. TaqI в 100 мкл реакционной смеси в буферном растворе, указанном производителем, при 65°C в течение 2 ч. Затем проводили спиртовую очистку ДНК. Осадок ДНК растворяли в необходимом количестве буфера TE (10 mM Трис-HCl pH 8,0; 1mM ЭДТА) так, чтобы ее концентрация составляла 0,1 мкг/мкл. Каждый из образцов Taq-обработанной ДНК в количестве 0,1 мкг затем расщепляли в 20 мкл реакционной смеси, 10 ед. акт. FatI (положительный контроль рестрикции для гена *RARB*), либо 16 ед. акт. BlnI (сайт узнавания 5'-Pu(5mC)GCNG(5mC)GPy-3'/3'-PyG(5mC)GNCG(5mC)Pu-5'), либо 16 ед. акт. GluI (сайт узнавания 5'-Pu(5mC)GPy-3'/3'-PyG(5mC)Pu-5) в реакционном буфере, рекомендованном производителем, при температуре 37°C (для HaeIII), 55°C (для FatI) и 30°C (для BlnI и GluI) в течение 2 ч (все реагенты производства НПО «СибЭнзим»). По окончании инкубации 1 мкл каждой реакционной смеси использовали для последующей амплификации с соответствующими праймерами. Амплификацию проводили с использованием набора для GC-ПЦР и HotStart Taq ДНК-полимеразы (производства НПО «СибЭнзим»). Праймеры для гена *RARB*: прямой-5' CCG GGT AGG GTT CAC CGA AAG TTC ACT CGC 3' и обратный-5' TCA GCA AAG GGA ATC AAT ATG CAT GCC AGC 3'; Профиль амплификации: 95°C — 5 мин, далее 40 циклов 95°C — 30 с, 68°C — 20 с, 72°C — 50 с; завершение реакции 72°C — 1 мин [17, 18]. После окончания амплификации проводили гель-электрофорез с последующей визуализацией ДНК бромистым этидием в УФ-свете. После обработки ДНК ферментами BlnI и GluI и последующим проведением ПЦР при наличии на электрофореграмме ампликонов размером 823 п.н. при анализе участка промоторной области и первого экзона гена *RARB*, отсутствии ампликона в положительном контроле рестрикции и наличие ампликона в отрицательном контроле рестрикции, биологический материал считается прошедшим контроль на отсутствие повышенного риска злокачественной трансформации клеток, связанного с эпигенетическим сверхметилированием регуляторной области гена-онкосупрессора *RARB*.

Результаты и их обсуждение. Проведено кариотипирование культивируемых ЭМСК ОЭ человека. В результате оценки культур 8–15 пассажей установлено, что на протяжении длительных сроков культивирования в клетках сохраняется диплоидный кариотип (46). Ни в одном из исследованных образцов (8) при подсчете 50–100 метафазных пластин не обнаружено отклонений от нормального числа хромосом (рисунок 1).

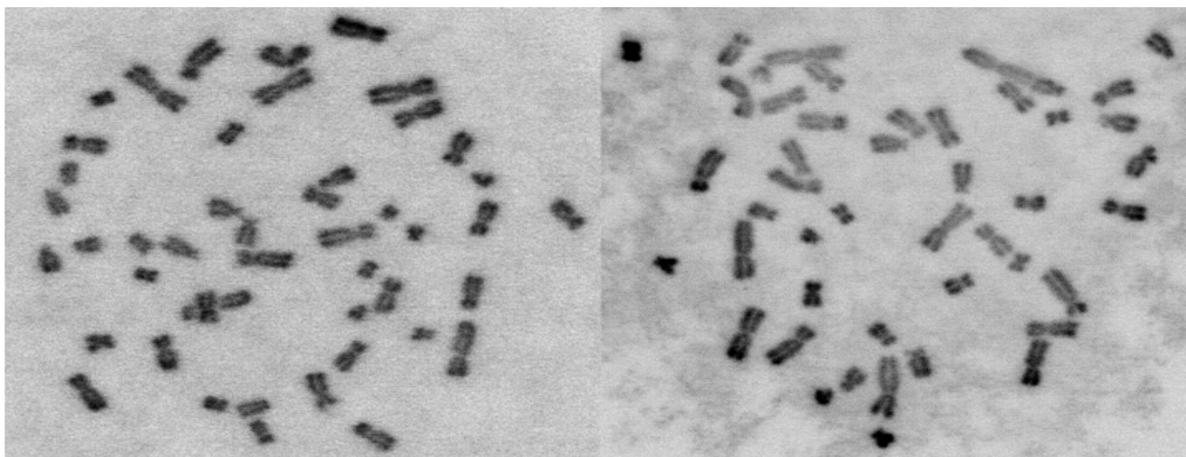


Рисунок 1 — Метафазные хромосомы культивируемых ЭМСК ОЭ (15 пассаж).
Флуоресцентная микроскопия ($\times 1000$)

Полученные данные свидетельствуют в пользу стабильности кариотипа культивируемых СПК ОЭ в оптимизированных условиях.

Вторым этапом данной работы стало изучение статуса метилирования регуляторного участка гена *RARB* размером 823 п.н., который включал промотор гена и часть первого экзона. Данный ген был выбран в качестве объекта исследования в связи с тем, что является онкосупрессором и вовлечен в многочисленные сигнальные пути, контролирующие регуляцию клеточного цикла, пролиферации, дифференцировки и старения клеток. Продуктом гена *RARB* является рецептор ретиноевой кислоты β (RAR β) — ядерный лиганд-зависимый транскрипционный фактор, который относится к рецепторам стероидных и тиреоидных гормонов. В норме ген находится в активном состоянии и его регуляторные области не имеют сайтов дополнительного метилирования. Показано, что появление в исследуемом участке гиперметилирования ведет к инактивации гена. Следствием молчания гена может стать злокачественная трансформация клетки, что подтверждается рядом исследований [13, 14, 17, 18, 24, 25]. Таким образом, выявление сайтов гиперметилирования в регуляторном участке гена *RARB* может быть важным маркером начальных стадий малигнизации в клетках, в т. ч. в ЭМСК ОЭ. Данный подход может применяться для оценки потенциального риска опухоле- и онкогенности культивируемых стволовых клеток.

Для выявления абберантного эпигенетического метилирования использовали хорошо зарекомендовавший себя и относительно простой в исполнении метод Bln I и Glu I ПЦР-анализа. Метод заключается в обработке ДНК метилзависимыми эндонуклеазами Glu I или Bln I и последующей амплификацией исследуемого фрагмента ДНК при проведении ПЦР (Гончар Д.А., 2010; Акишев А.Г., 2011). В исследуемом участке *RARB* имеется 4 сайта 5'-PuCGPy-3', которые могут быть метилированы ферментами Dnmt3a и Dnmt3b [17, 18] и распознаны рестриктазой Glu I. При этом в исследуемом участке нет комбинации сайтов, когда две последовательности 5'-PuCGPy-3' разделены одним нуклеотидом, и соответственно даже при наличии метилирования Bln I ПЦР-анализ покажет отрицательный результат рестрикции, тем не менее Bln I ПЦР-анализ также проводили для дополнительного внутреннего контроля.

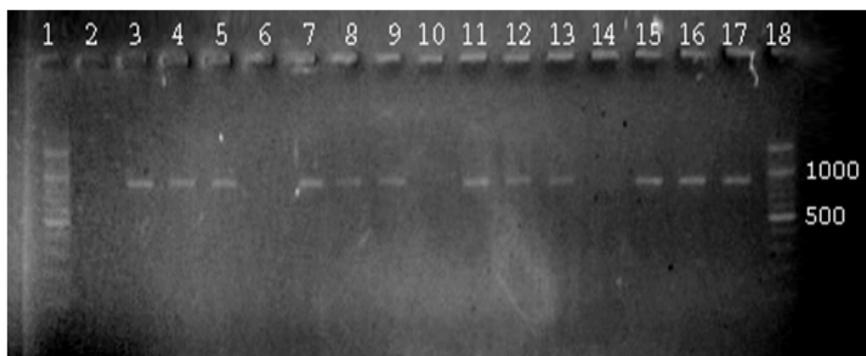


Рисунок 2 — Электрофореграмма продуктов Bln I и Glu I ПЦР-анализа метилирования промотора гена *RARB*: дорожка 1, 18 — ДНК-маркер; дорожки 2, 6, 10, 14 — положительный контроль рестрикции эндонуклеазой HaeIII (нет продукта ПЦР); дорожки 5, 9, 13, 17 — отрицательный контроль рестрикции, эндонуклеазы не добавлялись (есть ПЦР-продукт, размер 823 п.н.); дорожки 2–5 — № 1, 3-й пассаж, культивирование после криоконсервации (FatI, GluI, BlnI, без добавления рестриктаз); дорожки 6–9 — № 2, 4-й пассаж, культивирование после криоконсервации (FatI, GluI, BlnI, без добавления рестриктаз); дорожки 10–13 — № 2, 3-й пассаж, культивирование с факторами роста — EGF, bFGF (FatI, GluI, BlnI, без добавления рестриктаз); Дорожки 14–17 — №3, 4-й пассаж, культивирование с факторами роста — EGF, bFGF (FatI, GluI, BlnI, без добавления рестриктаз)

В результате проведения Bln I и Glu I ПЦР-анализа метилирования регуляторного участка гена-онкосупрессора *RARB* в культурах ЭМСК ОЭ, рекультивированных после криоконсервации и накопленный в присутствии факторов роста, установлено, что во всех случаях образовывался ПЦР-продукт — отрицательный результат рестрикции (рисунки 1 и 2). Это свидетельствует о том, что в

изучаемых CpG-участках регуляторной области онкосупрессора отсутствовали сайты узнавания для метил-зависимых рестриктаз Bln I и Glu I, т. е. ген находится в активном состоянии.

В случае обработки клеточной ДНК рестриктазой, сайт узнавания которой присутствует в ограниченной праймерами области (рестриктаза FatI), после проведения ПЦР искомым ампликон не детектировался на электрофореграмме — положительный контроль рестрикции. В образцах ДНК, не обработанных рестриктазами, в процессе прохождения реакции накапливался ПЦР-продукт — отрицательный контроль рестрикции. На электрофореграмме видно, что в отрицательном контроле интенсивность свечения полосы с продуктом амплификации такая же, как и в случае Bln I и Glu I ПЦР-анализа.

Заключение. Установлено, что в процессе культивирования и накопления биомассы культур ЭМСК ОЭ человека не отмечается повышения риска злокачественной трансформации клеток, связанного с нарушением кариотипа и абберантным метилированием регуляторной области гена онкосупрессора RARb. Вышеизложенные результаты свидетельствуют в пользу генетической стабильности культивируемых ЭМСК ОЭ в условиях, оптимизированных для накопления их биомассы, и указывают на безопасность использования ЭМСК ОЭ человека в клеточной терапии.

Литература

1. Mesenchymal stem cells in tissue repair [Electronic resource] / A.M. Dimarino [et al.] // *Front Immunol.* — 2013. — Vol. 4. — doi: 10.3389/fimmu.2013.00201. — Mode of access: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3761350/pdf/fimmu-04-00201.pdf>. — Date of access: 07.07.2014.
2. Mesenchymal Stem Cell treatment for autoimmune diseases: a critical review / E. Fernando [et al.] // *Biol. Res.* — 2012. — Vol. 45, № 3. — P. 269–277.
3. The role of immunosuppression of mesenchymal stem cells in tissue repair and tumor growth / Z. Han [et al.] // *Cell & Bioscience.* — 2012. — Vol. 2. — P. 8–15. — doi: 10.1186/1756-8722-5-19. — Mode of access: <http://www.jhoonline.org/content/pdf/1756-8722-5-19.pdf>. — Date of access: 07.07.2014.
4. Wang, S. Clinical applications of mesenchymal stem cells / S. Wang, X. Qu, R. C. Zhao [Electronic resource] // *J. Hematol. & Oncol.* — 2012. — Vol. 5.
5. Robert M. Safety in mesenchymal stem cell transplantation / M. Robert // *Biomed. Res. Therapy.* — 2014. — Vol. 1. — P. 21–24.
6. Herberts C.A. Risk factors in the development of stem cell therapy / C.A. Herberts, M. Kwa, H. Hermsen // *J. Translat. Med.* — 2011. — Vol. 9. — P. 29–43.
7. Safety of mesenchymal stem cells for clinical application [Electronic resource] / Y. Wang [et al.] // *Stem Cells Int.* — 2012. — Vol. 2012. — article ID 652034. — Mode of access: <http://dx.doi.org/10.1155/2012/652034P>. — Date of access: 07.07.2014.
8. Outgrowth of a transformed cell population derived from normal human BM mesenchymal stem cell culture / Y. Wang [et al.] // *Cytotherapy.* — 2005. — Vol. 7. — P. 509–519.
9. Цитогенетическое исследование мультипотентных мезенхимных стромальных клеток человека в процессе культивирования / Н.П. Бочков [и др.] // *Мед. генетика.* — 2009. — № 12. — С. 3–6.
10. Genetic and epigenetic instability of human bone marrow mesenchymal stem cells expanded in autologous serum or fetal bovine serum / J.A. Dahl [et al.] // *Int. J. Dev. Biol.* — 2008. — Vol. 52. — P. 1033–1042.
11. Genetic evaluation of mesenchymal stem cells by G-banded karyotyping in a Cell Technology Center / T. Borgonovo [et al.] // *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* — 2014. — Vol. 36, № 3. — P. 202–207.
12. Long-term cultured mesenchymal stem cells frequently develop genomic mutations but do not undergo malignant transformation / Y. Wang [et al.] // *Cell Death Dis.* — 2013. — Vol. 4. — P. 480–491.
13. Esteller, M. Aberrant DNA methylation as a cancer-inducing mechanism / M. Esteller // *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* — 2005. — Vol. 45. — P. 629–656.
14. DNA methylation changes during in vitro propagation of human mesenchymal stem cells: implications for their genomic stability? [Electronic resource] / A. Bentivegna [et al.] // *Stem Cells Int.* — 2013. — Article ID 192425, 9 p. — Mode of access: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/192425>. — Date of access: 07.07.2014.
15. Identification of a CpG island methylator phenotype that defines a distinct subgroup of glioma / H. Noshmehr [et al.] // *Cancer Cell.* — 2010. — Vol. 17, № 5. — P. 510–522.
16. Assessment of DNA methylation for the detection of cervical neoplasia in liquid-based cytology specimens / J.H. Kim [et al.] // *Gynecol. Oncol.* — 2010. — Vol. 116, № 1. — P. 99–104.
17. Гончар, Д.А. BlnI- и GluI- ПЦР анализ — новый метод исследования метилированных участков ДНК / Д.А. Гончар, А.Г. Акишев, С.Х. Дегтярев // *Вестн. биотехн. и физ.-хим. биологии им. Ю.А. Овчинникова.* — 2010. — Т. 6, № 1. — С. 5–12.
18. Эпигенетическое типирование малигнанных клеточных линий человека с помощью BlnI- и GluI ПЦР-анализа / А.Г. Акишев [и др.] // *Вестн. биотехн. и физ.-хим. биологии им. Ю.А. Овчинникова.* — 2011. — Т. 7, № 3. — С. 5–16.
19. Tome, M. Identification of nonepithelial multipotent cells in the embryonic olfactory mucosa / M. Tome // *Stem Cells.* — 2009. — Vol. 27, № 9. — P. 2196–2208.
20. Mackay-Sim, A. Stem cells and their niche in the adult olfactory mucosa / A. Mackay-Sim // *Arch. Ital. Biolog.* — 2010. — Vol. 148. — P. 47–58.
21. Стволовые и прогениторные клетки обонятельной выстилки человека: условия выделения и накопления в культуре, морфофункциональная и фенотипическая характеристика / Н.Г. Антонец [и др.] // *Клеточные культуры: информ. бюл.* — СПб.: Изд-во Политехн. ун-та, 2012. — Вып. 28. — С. 27–36.

22. Engraftment of human nasal olfactory stem cells restores neuroplasticity in mice with hippocampal lesions / N. Nivet [et al.] // *J. Clin. Investig.* — 2011. — Vol. 121, № 7. — P.2808–2820.
23. Functional Effects of Adult Human Olfactory Stem Cells on Early-Onset Sensorineural Hearing Loss / S. Pandit [et al.] // *Stem Cells.* — 2011. — Vol. 6. — P. 670–677.
24. Methylation of Retinoic Acid Receptor, Beta (RAR β) Gene Increases Risk for Prostate Cancer in African-American Men Cancer Epidemiol Biomarkers / B. Rybicki [et al.] // *J. Urol.* — 2011. — Vol. 20. — P. 317–324.
25. Methylation of the RAR β gene increases prostate cancer risk in black Americans. / D. Tang [et al.] // *J. Urol.* — 2013. — Vol. 190, № 1. — P. 317–324.

EVALUATION OF GENETIC STABILITY OF CULTURED HUMAN OLFACTORY EPITHELIUM-DERIVED ECTOMESENCHYMAL STEM CELLS

Antonevich N.G.¹, Hancharou A.Y.¹, Kvacheva Z.B.², Chekan V.L.³, Sidorenko I.V.³, Petrova L.G.³

¹*Republican Research & Practical Centre for Epidemiology & Microbiology, Minsk;*

²*Institute of Biophysics & Cellular Engineering of NAS of Belarus, Minsk;*

³*Belarusian State Medical Academy of Postdegree Education, Minsk, Belarus*

Increased malignant transformation risk of cultured human olfactory epithelium-derived ectomesenchymal stem cells (OE-eMSC) associated with karyotype abnormality and epigenetic hypermethylation in *RARB* promoters was not detected. Observed genetic stability give evidence that OE-eMSC-based cell therapy is safe for human.

Keywords: ectomesenchymal stem cells, human olfactory epithelium, culture, cell therapy.

Поступила 24.06.2014

ОСТРЫЕ РЕСПИРАТОРНЫЕ ИНФЕКЦИИ, ПЕРИНАТАЛЬНЫЕ НАРУШЕНИЯ И ДРУГИЕ ФАКТОРЫ РИСКА В ГЕНЕЗЕ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ У ДЕТЕЙ

Вальчук И.Н., Чистенко Г.Н., Дронина А.М.

Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь

Реферат. Установлена взаимосвязь между частотой случаев заболевания острыми респираторными инфекциями и относительным риском развития бронхиальной астмы. Определено сочетанное влияние некоторых патологических состояний у новорожденных и их матерей в период беременности и высокой частоты случаев заболевания детей острыми респираторными инфекциями в год как факторов риска последующего развития бронхиальной астмы у детей.

Ключевые слова: бронхиальная астма, дети, острые респираторные инфекции, перинатальные нарушения, патология беременных.

Введение. В структуре аллергических заболеваний проблема бронхиальной астмы (БА) у детей занимает одно из ведущих мест. Это связано с увеличением частоты заболеваемости и утяжелением течения этой формы респираторного аллергоза [1, 2].

БА является хроническим мультифакторным заболеванием, ее развитие тесно связано с воздействием генетических и внешнесредовых (экологических) факторов. Наряду с изучением основного механизма развития БА в настоящее время стали привлекать внимание факторы, усугубляющие риск развития болезни при воздействии причинного фактора. К ним относятся острые респираторные инфекции (ОРИ), перинатальные нарушения, патологическое течение беременности у матери ребенка и другие [1, 3]. Механизмы воздействия этих факторов необычайно сложны и многообразны. Владение точными количественными характеристиками приведенного спектра факторов риска и всесторонний анализ их взаимосвязи с БА является очевидным и необходим для совершенствования эффективности системы профилактики астмы [4, 5].

Цель работы — определение сочетанного влияния патологических состояний у новорожденных и их матерей в период беременности и высокой частоты случаев заболевания детей ОРИ в год как факторов риска последующего развития бронхиальной астмы.

Материалы и методы. Повозрастную динамику доли детей, болеющих ОРИ 4–6 раз и более в год, изучали у 337 детей, заболевших БА в 4, 5, 6, 7 и 8–11 лет. В процессе исследования за каж-

гия) в сочетании с высокой частотой случаев заболевания детей ОРВИ в год (4–6 раз и более) следует рассматривать как сопряженные факторы риска последующего развития заболевания БА у детей.

Литература

1. Бронхиальная астма у детей: учеб.-метод. пособие / Л.Г. Садовнича [и др.]. — Ростов н/Д: Феникс, 2007. — 176 с.
2. Кондюрина, Е.Г. ОРВИ и бронхиальная астма / Е.Г. Кондюрина, Т.Н. Елкина, В.В. Зеленская // Леч. врач. — 2005. — № 9. — С. 28–32.
3. Избранные лекции по педиатрии / под ред. А.А. Баранова, Р.Р. Шилява, Б.С. Копанюка. — М.: Издат. дом «Династия», 2005. — 640 с.
4. Респираторные заболевания у детей [Электронный ресурс] // Медицинский справочник болезней и лекарств. — 2009. — Режим доступа: <http://lekmed.ru/info/literatya/respiratornye-zabolevaniya-u-detei-17.html>. — Дата доступа: 27.04.2009.
5. Факторы риска развития бронхиальной астмы [Электронный ресурс] // Медицинский справочник. — 2010. — Режим доступа: <http://med-tutorial.ru/med-books/book/47/page/3-chast-iii-detskie-bolezni/216-bronhialnaya-astma>. — Дата доступа: 23.08.2010.
6. Эпидемиологическая диагностика: учеб. пособие / Г.Н. Чистенко [и др.]; под ред. Г.Н. Чистенко. — Минск, 2007. — 148 с.
7. Новорожденные высокого риска / под ред. В.И. Кулакова, Ю.И. Барашнева. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2006. — 528 с.

ACUTE RESPIRATORY INFECTIONS, PERINATAL DISORDERS AND OTHER RISK FACTORS IN THE DEVELOPMENT OF BRONCHIAL ASTHMA IN CHILDREN

Valchuk I.N., Chistenko G.N., Dronina A.M.

Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus

The relationship between the frequency of cases of acute respiratory infections and the relative risk of developing asthma. In the group of children who became ill with asthma at a younger age (0–4 years), the incidence of acute respiratory infections 4–6 times and 7–10 times or more per year are risk factors for asthma in all age periods of the group. In childhood asthma at the age of 5–7 years, these risk factors exert their effects, ranging from 3 years of age. Among the children who are sick with asthma aged 8–11 years, represent a significant risk factor for acute respiratory infections diseases with a frequency of 4–6 events per year in the age period 4–7 years. Defined by a combined effect of pathological conditions in the newborn (haemorrhagic and haematological disorders, diseases of the integument, infectious diseases, and specific to the perinatal period) and their mothers during pregnancy (gestosis, chronic extragenital pathology) and high frequency of cases of children with acute respiratory infections in a year risk factors for subsequent development of asthma.

Keywords: asthma, children, acute respiratory infections, perinatal disorders, pathological pregnancy.

Поступила 09.09.2014

СУБПОПУЛЯЦИИ МОНОЦИТОВ, ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК И МИЕЛОИДНЫХ СУПРЕССОРНЫХ КЛЕТОК ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У ПАЦИЕНТОВ С ИНФЕКЦИОННЫМ МОНОНУКЛЕОЗОМ

Гончаров А.Е.¹, Давидович Г.М.^{1,2}, Романова И.В.¹, Дуж. Е.В.¹

¹РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Минск;

²Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь

Реферат. В исследовании определяли относительное и абсолютное содержание минорных субпопуляций лейкоцитов периферической крови у пациентов с инфекционным мононуклеозом в сравнении с группой здоровых добровольцев: плазмациитоидных дендритных клеток, CD1c⁺ и CD141⁺ субпопуляций миелоидных дендритных клеток, моноцитов крови и миелоидных супрессорных клеток моноцитарного и гранулоцитарного (CD15⁺ и CD33⁺) происхождения. У пациентов с инфекционным мононуклеозом выявлено изменение соотношения субпопуляций миелоидных дендритных клеток в сторону CD141⁺ клеток, что, вероятно, указывает на их участие в этиопатогенезе заболева-

ния. Установлено многократное снижение содержания плазмациитоидных ДК, что дает возможность предположить миграцию пДК в лимфоидную ткань либо избирательную гибель клеток. Также выявлено уменьшение пула миелоидных супрессорных клеток моноцитарного происхождения, указывающее на гиперстимуляцию клеток иммунной системы, что выражается в усилении экспрессии молекулы HLA-DR клетками.

Ключевые слова: инфекционный мононуклеоз, иммунный статус, ВЭБ-инфекция, дендритные клетки, моноциты, миелоидные супрессорные клетки.

Введение. Инфекционный мононуклеоз (ИМ) — острое доброкачественное лимфопролиферативное заболевание человека, вызванное вирусом Эпштейна–Барр (ВЭБ), характеризующееся наличием у пациента лихорадки, лимфоаденопатии, поражения селезенки и печени, характерными изменениями гемограммы [1].

Первичная ВЭБ-инфекция проявляется в виде респираторной инфекции (40% случаев) или в виде ИМ (около 20%), а также может протекать бессимптомно [2, 3]. В настоящее время у 80–90% населения земного шара выявлена персистенция этого вируса. Рост заболеваемости ИМ отмечается во всех регионах. В Республике Беларусь заболеваемость постепенно возросла с 3,73 случая на 100 тыс. населения в 1991 г. до 64,2 случая на 100 тыс. населения в 2011 г. [4].

Клиническая значимость ИМ обусловлена вовлечением в патологический процесс иммунной, сердечно-сосудистой, пищеварительной, мочевыделительной, нервной и эндокринной систем. Хронизация ВЭБ может привести к неблагоприятным последствиям в виде: Х-связанного лимфопролиферативного синдрома, В-лимфопролиферативных заболеваний (включая посттрансплантационные и ВИЧ-ассоциированные лимфомы — связь с ВЭБ до 90%), лимфомы Беркитта (связь с ВЭБ до 97–100%, а у пациентов с ВИЧ — до 100%), Ходжкинской болезни (связь с ВЭБ до 80%), Т-клеточной лимфомы, синдрома хронической усталости, ВЭБ-ассоциированного гемофагоцитарного синдрома и ряда других заболеваний [1].

В настоящее время имеются данные о связи ВЭБ с развитием острых, хронических и аутоиммунных гепатитов. Особое значение придается связи персистенции ВЭБ с развитием опухолей, поражающих эпителий: волосатой лейкоплакии языка (до 100% у больных с ВИЧ-инфекцией), назофарингеальной карциномы, карциномы желудка [1, 4].

ВЭБ способен вызывать значительные нарушения в иммунном статусе человека: изменение количества и свойств отдельных популяций лимфоцитов и гранулоцитов, нарушение функциональной активности моноцитов, дисбаланс продукции цитокинов. Известно, что ВЭБ обладает тропностью к Т-, В-лимфоцитам и другим иммунокомпетентным клеткам, длительно персистирует в латентном состоянии в В-лимфоцитах. В результате развивается вторичная иммунная недостаточность с выраженной депрессией клеточного иммунитета. В то же время сведения о роли клеточного и гуморального иммунного ответа в иммунопатогенезе ИМ довольно противоречивы. Помимо этого до сих пор не известны клинико-лабораторные критерии, которые позволили бы прогнозировать исход острой ВЭБ-инфекции [3, 5–8].

В последние годы основную роль в модуляции иммунного ответа отводят минорным субпопуляциям лейкоцитов крови. К таким клеткам относят субпопуляции моноцитов, дендритных клеток (ДК), миелоидных супрессорных клеток (МЛСК), истощенных и анергичных Т-лимфоцитов, регуляторных CD8⁺ и TCRγδ⁺ Т-клеток и др. Роль этих субпопуляций в патогенезе ИМ не изучена или изучена недостаточно.

Цель работы — анализ содержания моноцитов, ДК и МЛСК в периферической крови у пациентов с острым ИМ.

Материалы и методы. *Объекты исследований.* Объектами для *in vitro* исследований служили 12 образцов периферической крови пациентов с ИМ (Городская клиническая инфекционная больница г. Минска), а также 10 здоровых добровольцев (РНПЦ эпидемиологии и микробиологии). Медианный возраст пациентов составил 21,0 (18,0–23,5) год, а здоровых добровольцев — 24 (26,0–28,0) года.

Определение иммунофенотипа клеток крови. Иммунофенотип лейкоцитов определяли методом проточной цитометрии. Использовали следующие моноклональные антитела: CD1c (APC, клон AD5-8E7), CD3 (FITC, клон UCST1), CD11b (APC, клон MEM-174), CD11c (PE-Cy7, клон B-ly6), CD14 (FITC, клон RMO52), CD15 (PE, клон MEM-158), CD16 (FITC, клон ICO-116), CD16 (APC, клон ICO-116), CD19 (FITC, клон J3-119), CD33 (PerCP-Cy5.5, клон WM53), CD123 (PE, клон

SSDCLY107D2), CD141 (PE, клон 1A4), HLA-DR (PE-Cy7, клон Immu-357), HLA-DR (BD Horizon™ V500, клон G46-6). Образец крови в количестве 100 мкл инкубировали с моноклональными антителами на протяжении 15 мин при температуре 4°C. Лизировали эритроциты раствором хлорида аммония, осаждали клетки центрифугированием, удаляли супернатант, суспендировали клетки в фосфатно-солевом буферном растворе. Учет проводили на проточных цитофлуориметрах «FACSCalibur» и «FACSCanto II». Для корректной настройки параметров компенсации готовили неокрашенные и «single-stained» контроли.

Статистический анализ. Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием непараметрических методов (U-критерий Манна–Уитни, коэффициент корреляции Спирмана). Значения показателей преимущественно представлены в виде медианы с интерквартильным размахом в виде 25 и 75-й процентилей. В качестве критерия достоверности различий показателей принимали уровень значимости $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. Анализ выбранных нами субпопуляций представляет определенную сложность. Это вызвано прежде всего отсутствием специфических маркеров к изучаемым субпопуляциям и, соответственно, необходимостью использовать в исследовании панели со несколькими антителами одновременно. Помимо этого многие исследуемые антигены отличаются невысокой плотностью экспрессии на клетке, соответственно, требуется использование антител, конъюгированных с наиболее яркими флуорохромами, и учет результатов на цитофлуориметре с высокой чувствительностью для получения хорошего разделения между позитивным и негативным сигналом. Принимая во внимание невысокое содержание субпопуляций клеток, которое редко достигает 1%, необходимо учитывать значительное число событий, как правило, не менее 200 тыс. на опыт, а также иметь возможность дискриминации конгломератов (doublets) клеток по параметрам прямого светорассеяния («FSC-Area» vs «FSC-Height»).

В связи с вышеизложенным анализ гранулоцитарных МЛСК (G-MDSC) и миелоидных ДК (мДК) крови осуществляли на более совершенном цитофлуориметре «FACSCanto II», в то время как субпопуляции моноцитов учитывали на проточном цитометре «FACSCalibur».

ДК крови представляют собой профессиональные антигенпредставляющие клетки, обеспечивающие инициацию и направленность адаптивного иммунного ответа. ДК человека по происхождению разделяют на 2 группы: мДК и плазмацитоидные ДК (пДК), дифференцированные из лимфоидных клеток-предшественников [9–11]. По экспрессии ряда молекул и выполняемым функциям можно выделить множество субпопуляций ДК. Так, мДК крови разделяют на 2 крупные субпопуляции: DC1, экспрессирующие молекулу CD1c (BDCA-1), и DC2 ДК, которые экспрессируют молекулу CD141 (BDCA-3), и функционально схожи с CD8⁺ ДК мышей [11]. пДК также разделяют на CD303 (BDCA-2)⁺ и CD304 (BDCA-4)⁺ клетки. ДК не экспрессируют популяционные (линейные) маркеры Т-, В- лимфоцитов, естественных киллеров, моноцитов и гранулоцитов, т. е. CD3, CD19, CD14, CD34, CD66b, CD56. Выполняемые ДК функции захвата антигена и его представления на мембране Т-клеток обуславливает широкий спектр поверхностных молекул, к которым относят патоген-распознающие рецепторы, молекулы ГКС II класса, костимуляторные и коингибиторные молекулы, молекулы клеточной адгезии, хемокиновые рецепторы.

Ранее выполненные исследования в РНПЦ эпидемиологии и микробиологии показали важную роль ДК в иммунопатогенезе инфекционных заболеваний, в частности вирусных гепатитов В и С и туберкулеза [11].

В процессе анализа мДК вначале исключали на цитограмме FSC-Area/FSC-Height конгломераты (doublets) из учета, затем визуально формировали регион лейкоцитов, в котором последовательно определяли границы региона мононуклеарных клеток (рисунок 1).

В полученном регионе анализировали экспрессию молекулы HLA-DR и популяционных маркеров (lin): CD3, CD14, CD16 и CD19. Учитывая, что ДК экспрессируют молекулы комплекса гистосовместимости II класса при отсутствии экспрессии маркеров других клеточных популяций, выделяли соответствующим образом регион, содержащий ДК. В данном регионе анализировали экспрессию молекулы CD11c — основного маркера мДК. Подсчитывали относительное число CD11c⁺ мДК среди лейкоцитов. Далее в регионе HLA-DR⁺lin⁻ учитывали число клеток, экспрессирующих молекулы CD11c и CD1c, а также CD11c и CD141hi.

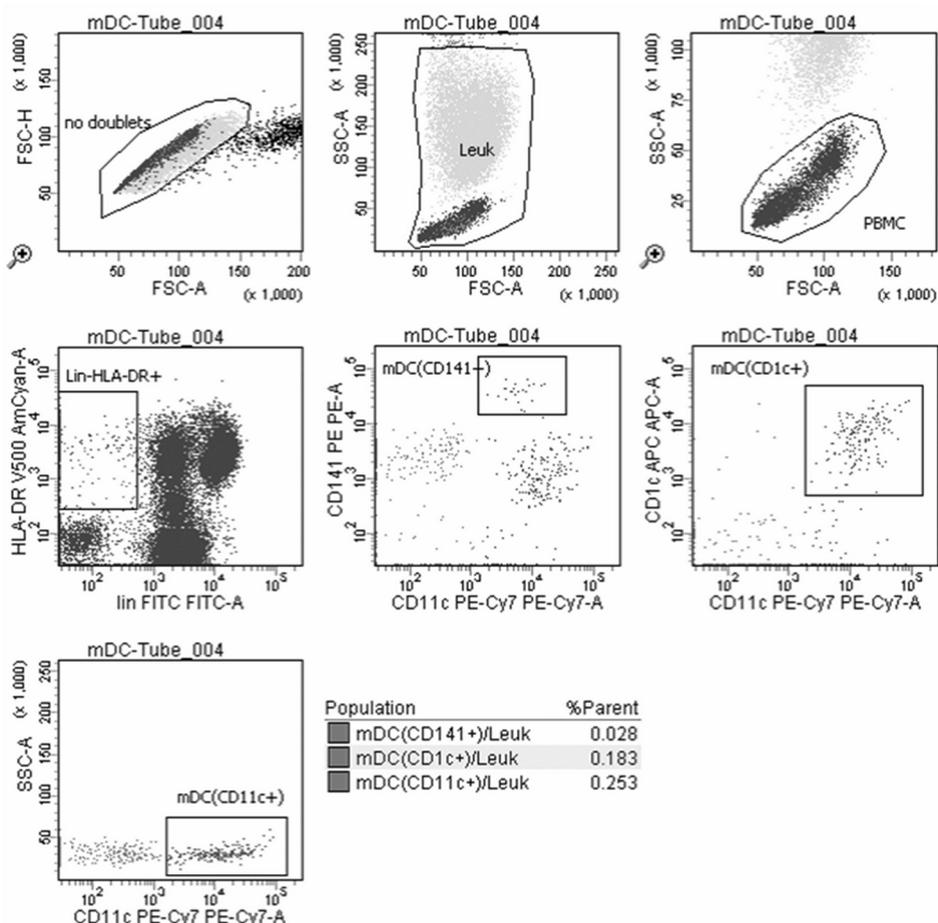


Рисунок 1 — Анализ содержания мДК в периферической крови

Анализ содержания мДК показал уменьшение относительного количества CD11c⁺ мДК ($p = 0,001$) в периферической крови пациентов с ИМ (таблица).

Абсолютное содержание всей фракции мДК оставалось в пределах контрольных значений ($p = 0,366$). Однако при этом относительное содержание CD1c⁺ субпопуляции ДК было уменьшено в 3 раза ($p = 0,001$), а абсолютное — в 2 ($p = 0,002$). В то же время и относительное, и абсолютное содержание CD141⁺ мДК было достоверно увеличено.

Соотношение CD1c⁺ мДК/CD141⁺ мДК составило 1,9 (1,4–2,6) у пациентов с ИМ и 6,2 (5,6–7,3) в группе здоровых добровольцев ($p = 0,00013$). Принимая во внимание результаты расчета данного соотношения, можно сделать вывод о том, что у пациентов с ИМ имеет место перераспределение BDCA-1 и BDCA-3 субпопуляций в сторону клеток с фенотипом BDCA-3. Данное наблюдение, по всей видимости, подтверждает ранее показанный факт вовлеченности CD141⁺ субпопуляции ДК в презентацию вирусных антигенов после поглощения фрагментов мертвых клеток, содержащих вирусные частицы, и указывает на участие BDCA-3⁺ мДК в иммунном ответе против ВЭБ [12].

Таблица — Содержание минорных субпопуляций клеток периферической крови у пациентов с ИМ

Субпопуляция лимфоцитов	Пациенты с ИМ (n = 12)	Здоровые добровольцы (n = 10)	p
CD15 ⁺ G-MDSC, % (от числа лейкоцитов)	0,041(0,024–0,069)	0,022 (0,007–0,048)	0,099
CD15 ⁺ G-MDSC, ×10 ⁶ /мл	0,003 (0,003–0,006)	0,001 (0,001–0,004)	0,052
CD33 ⁺ G-MDSC, % (от числа лейкоцитов)	0,053 (0,040–0,084)	0,021 (0,018–0,026)	0,448
CD33 ⁺ G-MDSC, ×10 ⁶ /мл	0,005 (0,004–0,009)	0,003 (0,001–0,006)	0,277
M-MDSC, % (от числа лейкоцитов)	0,075 (0,05–0,135)	0,32 (0,23–0,37)	0,011
M-MDSC, ×10 ⁶ /мл	0,006 (0,005–0,014)	0,018 (0,016–0,026)	0,0027

CD11c ⁺ мДК, % (от числа лейкоцитов)	0,134 (0,113–0,195)	0,255 (0,224–0,360)	0,001
CD11c ⁺ мДК, ×10 ⁶ /мл	0,014 (0,012–0,016)	0,016 (0,012–0,021)	0,366
CD1c ⁺ мДК, % (от числа лейкоцитов)	0,042 (0,030–0,056)	0,142 (0,106–0,156)	0,001
CD1c ⁺ мДК, ×10 ⁶ /мл	0,004 (0,003–0,005)	0,009 (0,006–0,012)	0,002
CD141 ⁺ мДК, % (от числа лейкоцитов)	0,022 (0,016–0,044)	0,021 (0,018–0,026)	0,553
CD141 ⁺ мДК, ×10 ⁶ /мл	0,002 (0,002–0,004)	0,001 (0,001–0,002)	0,023
пДК, % (от числа лейкоцитов)	0,04 (0,02–0,11)	0,400 (0,250–0,520)	0,000001
пДК, ×10 ⁶ /мл	0,003 (0,002–0,01)	0,022 (0,013–0,032)	0,00017
«Классические» моноциты, % (от суммарного числа CD14 ⁺ клеток)	89,95 (87,62–92,10)	86,3 (82,4–88,4)	0,032
«Классические» моноциты, ×10 ⁶ /мл	0,513 (0,347–0,630)	0,368 (0,298–0,429)	0,199
«Промежуточные» моноциты, % (от суммарного числа CD14 ⁺ клеток)	5,63 (3,39–7,19)	3,4 (1,9–5,4)	0,07
«Промежуточные» моноциты, ×10 ⁶ /мл	0,031 (0,023–0,048)	0,016 (0,006–0,022)	0,016
«Неклассические» моноциты, % (от суммарного числа CD14 ⁺ клеток)	1,64 (0,41–2,19)	5,1 (0,9–7,0)	0,093

Миелоидные супрессорные клетки представляют собой крайне гетерогенную популяцию активированных незрелых клеток миелоидного происхождения, которая обладает способностью подавлять эффекторный иммунный ответ [13–15].

МЛСК человека имеют моноцитарное либо гранулоцитарное происхождение. Известно, что G-MDSC являются незрелыми миелоидными клетками, не несущими популяционных маркеров зрелых гранулоцитов и молекул II класса ГКС, но экспрессирующими молекулы CD11b, CD33 и/или CD15 [13]. Наиболее часто иммунофенотип G-MDSC описывают как lin⁻HLA-DR⁻CD33⁺CD11b⁺CD15⁺, а иммунофенотип МЛСК моноцитарного происхождения (M-MDSC) как lin⁻HLA-DR⁻CD14⁺. В то же время ряд авторов под МЛСК понимает CD33⁺HLA-DR⁻ клетки, под G-MDSC — CD66b⁺/CD33int/HLA-DR⁻, CD11b⁺VEGFR1⁺CD66b⁺, CD62L^{lo/neg}CD16^{lo/neg}, CD33⁺HLA-DR^{low}HIF1α⁺/STAT3⁺ или CD11b⁺HLA-DR^{low}C/EBPβ⁺ клетки, а под M-MDSC — CD33⁺/CD14⁺/HLA-DR^{low}, причем этот список можно было бы существенно пополнить. Тем не менее ни один из предложенных вариантов до сих пор не получил широкого распространения, и несмотря на многочисленные исследования, популяция МЛСК продолжает оставаться относительно слабо охарактеризованной.

К настоящему времени накоплена информация о роли МЛСК в иммунопатогенезе рака. Показано значительное увеличение доли G-MDSC и M-MDSC у пациентов, страдающих раком разной локализации, преимущественно на поздних стадиях болезни [13, 15]. Учитывая выявленную способность МЛСК подавлять пролиферацию и вызывать анергию Т-клеток, в т. ч. CD8⁺ лимфоцитов, стимулировать формирование Т-регуляторных клеток, ингибировать функциональную активность АПК, в последние годы предположено, что МЛСК играют важную роль в хронизации вирусных инфекций [16]. Так, в ряде работ развернулась дискуссия о роли G-MDSC в патогенезе хронического гепатита С. Показано, что CD33⁺ клетки после культивирования с гепатоцитами, зараженными HCV или HCV core-белком, приобрели иммунофенотип характерный для супрессорных клеток (CD14⁺CD11b^{+/low}HLA-DR^{-/low}) и отличались способностью подавлять активацию Т-клеток [17].

В настоящем исследовании гейтирование G-MDSC осуществляли следующим образом. На точечной цитограмме, построенной в координатах FSC-Area и FSC-Height, выделяли регион, не содержащий клеточные конгломераты (рисунок 2).

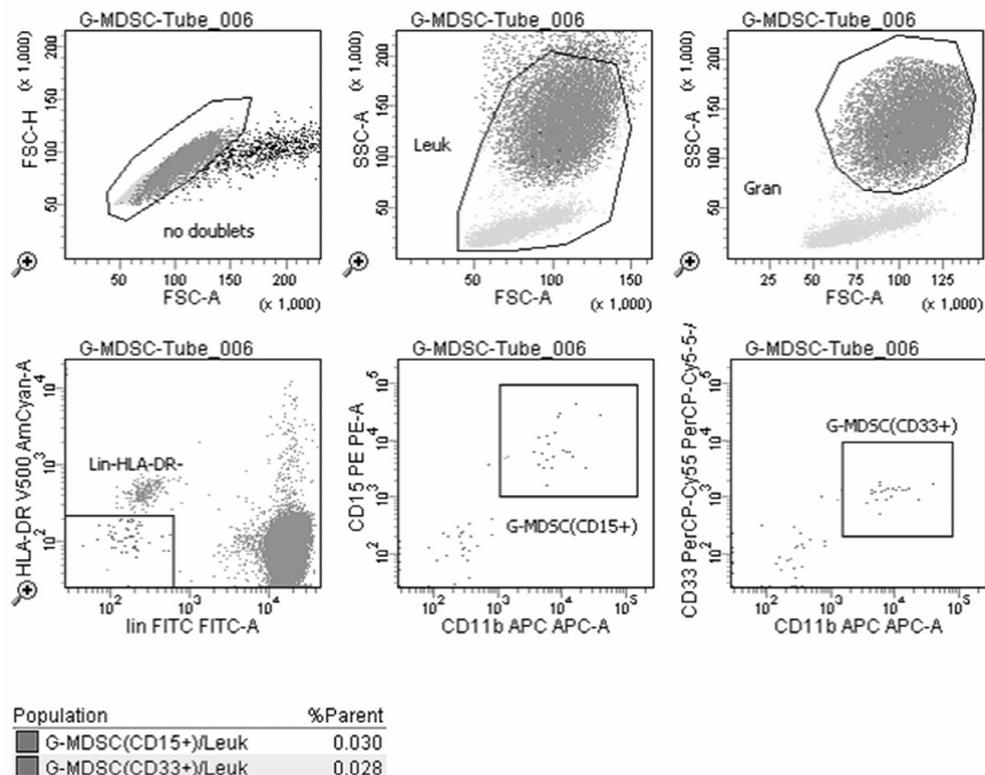


Рисунок 2 — Анализ содержания МЛСК гранулоцитарного происхождения в периферической крови

В полученном регионе на цитограмме светорассеяния отграничивали регион лейкоцитов, а затем нейтрофилов. В регионе, содержащем нейтрофилы, анализировали экспрессию молекулы HLA-DR и популяционных маркеров. Выделяли регион клеток, не экспрессирующих HLA-DR и lin-маркеры. Клетки в данном регионе проецировали на цитограммы в координатах CD11b/CD15 и CD11b/CD33. G-MDSC определяли как клетки, ко-экспрессирующие два маркера: CD11b⁺CD15⁺ и CD11b⁺CD33⁺.

Результаты наших исследований показывают, что у пациентов с ИМ выявлена тенденция к увеличению относительного ($p = 0,099$) и абсолютного ($p = 0,052$) содержания CD15⁺ G-MDSC (таблица).

В то же время статистически достоверных изменений количества CD33⁺ G-MDSC выявлено не было.

Следует обратить внимание на значительную вариабельность содержания G-MDSC как у пациентов с ИМ, так и у здоровых добровольцев. Так, у пациентов с ИМ медианное количество CD15⁺ G-MDSC составило 0,041 (0,024–0,069)% (минимальное значение — 0,01%, максимальное — 0,22%). У здоровых добровольцев — 0,022 (0,007–0,048)% (минимум — 0,004%, максимум — 0,167%).

Что касается количества CD33⁺ G-MDSC, то минимальное содержание у пациентов, страдающих ИМ, составило 0,02%, а максимальное — 0,238%; в группе сравнения минимальное значение — 0,012%, максимальное — 0,192%, т. е. значения показателя отличаются в 12–16 раз.

Следует отметить, что количественные показатели G-MDSC, полученные в настоящем исследовании, значительно ниже, чем показано в некоторых работах. Ответ на данный вопрос заключается, как мы считаем, в стратегии гейтирования. Полученный опыт показывает, что в процессе анализа G-MDSC следует выделять только регион гранулоцитов. В ряде работ авторы выполняли поиск G-MDSC среди всех лейкоцитов, включая мононуклеарные клетки [13, 14]. На наш взгляд, такой

подход к гейтированию некорректен, т. к. не позволяет исключить из подсчета базофилы — клетки с небольшими размерами и гранулярностью (FSClo SSClo), не экспрессирующие HLA-DR, и популяционные маркеры CD3, CD14, CD19, слабо экспрессирующие молекулу CD16 и характеризующиеся высокой экспрессией миелоидных маркеров — CD11b, CD15 и особенно CD33. Таким образом, содержание G-MDSC в некоторых исследованиях завышено за счет включения базофилов.

Моноциты крови являются предшественниками антигенпредставляющих клеток: макрофагов, клеток Лангерганса, интерстициальных ДК и др. [18, 19]. Моноциты в настоящее время рассматривают как гетерогенную популяцию клеток. По степени экспрессии молекул CD14 и CD16 охарактеризованы основные 3 субпопуляции: 1) классические (classical) моноциты CD14⁺⁺CD16⁻; 2) промежуточные (intermediate) моноциты CD14⁺⁺CD16⁺; 3) неклассические (non-classical) моноциты CD14⁺CD16⁺⁺ [19].

В процессе жизненного цикла классические моноциты по всей видимости дифференцируются в промежуточные и неклассические моноциты. Дискутируется роль промежуточных и неклассических моноцитов при различных патологических состояниях. Так, увеличение доли неклассических и промежуточных моноцитов установлено у пациентов с сепсисом, РА, тяжелым течением бронхиальной астмы [9, 20].

Используемая нами панель антител позволяет выполнять одновременно определение субпопуляций моноцитов, пДК и M-MDSC (рисунок 3).

Выполняется последовательное гейтирование лейкоцитов, мононуклеаров, а затем CD14⁺ и CD14⁻ клеток. В регионе, содержащем CD14⁺ моноциты, анализируется интенсивность экспрессии молекул CD14 и CD16 на двухмерных цитограммах. По интенсивности экспрессии вышеуказанных молекул моноциты могут быть разделены на 3 субпопуляции: «классические» моноциты, «промежуточные» и «неклассические» моноциты. Проводится расчет процентного содержания данных субпопуляций от числа всех CD14⁺ моноцитов крови. Регион, содержащий CD14⁻ клетки, проецируют на двухмерную цитограмму экспрессии CD123 и HLA-DR. Выделяют регион пДК — CD123^{hi} HLA-DR⁺ клеток. Затем визуализируют CD14⁺ клетки на цитограмме CD14/HLA-DR. Формируют регион CD14⁺HLA-DR^{-lo} клеток, которые являются M-MDSC. Рассчитывают число M-MDSC среди лейкоцитов.

Общегрупповое относительное содержание фракции пДК среди лейкоцитов крови было достоверно снижено у пациентов с ИМ в 10 раз ($p = 0,000001$), а абсолютное — в 7 раз ($p = 0,00017$) по сравнению с аналогичными показателями в группе здоровых добровольцев, что, вероятно, указывает на вовлеченность пДК (одних из основных продуцентов ИНФ-альфа) в иммунопатогенез ИМ.

Из литературных источников известно, что ВЭБ инициирует апоптоз моноцитарных ДК человека и нарушает процессы созревания ДК [21]. В то же время влияние ВЭБ на пДК изучено недостаточно. Описаны лишь эксперименты по стимуляции выделенных из крови пДК вирусом Эпштейна-Барр, которые показали усиление продукции клетками интерферона- α [22].

Результаты наших экспериментов позволяют предположить как миграцию пДК в лимфоидную ткань, так и избирательную гибель клеток в результате инфицирования вирусом или вследствие других причин. В связи с этим требуются дальнейшие эксперименты для уточнения причины значительного снижения содержания пДК у пациентов с ИМ.

Учитывая тот факт, что снижение числа пДК ниже 0,1% выявлено у 7 пациентов из 12 ($58,3 \pm 14,2\%$), представляет интерес дальнейшее наблюдение за пациентами с целью выявления ассоциации содержания пДК в периферической крови и исхода заболевания (выздоровление, затяжное течение, хронизация и др.).

Анализ содержания моноцитов показал наличие тенденции к увеличению относительного числа «промежуточных» моноцитов в общей фракции моноцитов ($p = 0,07$). Установлено достоверное увеличение абсолютного числа этой субпопуляции в 2 раза ($p = 0,016$). Также выявлено увеличение содержания «классических» моноцитов у пациентов с ИМ (ИМ – 89,95 (87,62–92,10)%, контроль — 86,3 (82,4–88,4)%, $p = 0,032$).

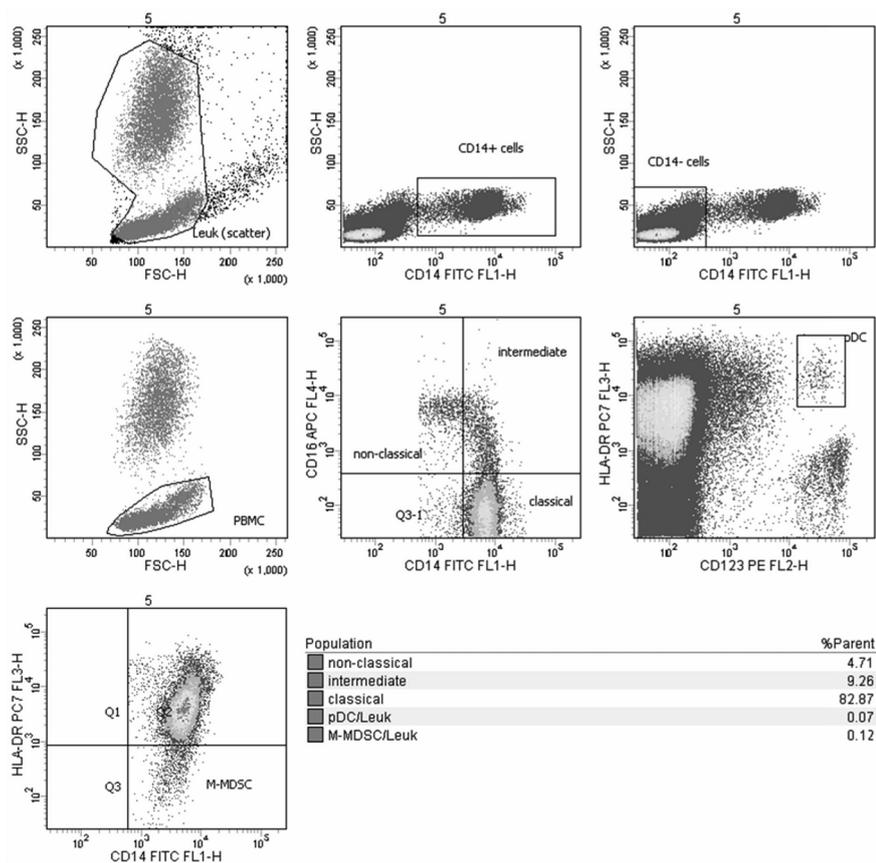


Рисунок 3 — Гейтирование моноцитов, пДК и М-MDSC

Содержание «неклассических» и «промежуточных» моноцитов сильно варьировало как у пациентов, так и у здоровых добровольцев. Минимальное содержание «неклассических» моноцитов составило 0,18%, а максимальное — 10,6%, «промежуточных»: минимальное — 0,54%, а максимальное — 6,26%. Подобная вариабельность затрудняет общегрупповой анализ данных даже с учетом использования непараметрических методов статистической обработки данных.

Были выявлены различные коррелятивные взаимосвязи между субпопуляциями моноцитов и ДК. Из представляющих интерес можно отметить отрицательную корреляцию между относительным числом CD11c⁺ мДК и «неклассической» фракции моноцитов ($R = -0,7$; $p = 0,01$), между абсолютным содержанием CD11c⁺ мДК и «промежуточной» фракции моноцитов ($R = -0,6$; $p = 0,04$), а также положительную корреляцию между абсолютным числом «неклассических» и «промежуточных» моноцитов ($R = 0,7$; $p = 0,01$).

У пациентов с ИМ установлено снижение относительного ($p = 0,011$) и абсолютного ($p = 0,0027$) числа М-MDSC, что, вероятно, указывает на значительную стимуляцию иммунокомпетентных клеток ВЭМ и усиление ими экспрессии молекулы HLA-DR.

Заключение. В результате исследований у пациентов с ИМ выявлено статистически достоверное снижение числа CD1c⁺ мДК и увеличение содержания CD141⁺ мДК, что указывает на участие BDCA-3⁺ мДК в иммунном ответе против ВЭБ. В то же время установлено многократное снижение содержания пДК среди лейкоцитов крови пациентов с ИМ, что может указывать как на миграцию пДК в лимфоидную ткань, так и избирательную гибель клеток.

Содержание М-MDSC было снижено, что, вероятно, указывает на стимуляцию CD14⁺ клеток ВЭМ и усиление ими экспрессии молекулы HLA-DR. В то же время у пациентов с ИМ выявлена тенденция к увеличению относительного и абсолютного содержания CD15⁺ G-MDSC.

Следует отметить, что установлена значительная вариабельность в содержании субпопуляций МЛСК и моноцитов крови как в группе пациентов с ИМ, так и у здоровых добровольцев.

Таким образом, результаты исследования указывают на существенные изменения в содержании субпопуляций МДСК, моноцитов и ДК у пациентов с ИМ и требуют дальнейших исследований для установления роли этих субпопуляций в этиопатогенезе болезни и возможности использования количественных показателей в рутинной клинической практике.

Литература

1. Краснов, В.В. Инфекционный мононуклеоз: клиника, диагностика / В.В. Краснов, А.И. Шипенко, Л.А. Кузенкова. — СПб.; Н.Новгород, 2003. — С. 1–4.
2. Крамарев, С.О. Эпштейна–Барр вирусная инфекция у детей / С.О. Крамарев, Н.Г. Литвиненко, Л.О. Палатная // Современная педиатрия. — 2004. — Т. 4, № 5. — С. 105–109.
3. Шестакова, И.В. Современные подходы к лечению Эпштейна-Барр-вирусной инфекции у взрослых / И.В. Шестакова, Н.Д. Ющук // Леч. врач. — 2011. — № 2. — С. 98–100.
4. Баннова, С.Л. Возрастные клинико-иммунологические аспекты инфекционного мононуклеоза Эпштейна–Барр вирусной этиологии на современном этапе: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.01.09; 14.03.09 / С.Л. Баннова. — СПб., 2010. — 21 с.
5. Acute infectious mononucleosis: characteristics of patients who report failure to recover / D.S. Buchwald [et al.] // Am. J. Med. — 2000. — Vol. 109, № 7. — P. 531–537.
6. Predictors of fatigue following the onset of infectious mononucleosis / B. Candy [et al.] // Psychol. Med. — 2003. — Vol. 33, № 5. — P.847–855.
7. Cameron, B. Prolonged Illness after Infectious Mononucleosis Is Associated with Altered Immunity but Not with Increased Viral Load / B. Cameron [et al.] // J. Infect. Dis. — 2006. — Vol. 193. — P. 664–671.
8. Chronic fatigue syndrome following infections in adolescents / B.Z. Katz [et al.] // Curr. Opin. Pediatr. — 2013. — Vol. 25, № 1. — P. 95–102.
9. Development of monocytes, macrophages and dendritic cells / F. Geissmann [et al.] // Sci. — 2010. — Vol. 327, № 5966. — P. 656–661.
10. An 11-color Flow Cytometric Assay for Identifying, Phenotyping, and Assessing Endocytic Ability of Peripheral Blood Dendritic Cell Subsets in a Single Platform / J.E. Wang [et al.] // J. Immunol. Meth. — 2009. — Vol. 341, № 1–2. — P. 106–116.
11. Состояние системы мононуклеарных фагоцитов (моноцитов, дендритных клеток) у пациентов с разными формами лекарственно-устойчивого туберкулеза легких / А.Е. Гончаров [и др.] // Весці НАН Беларусі. Сер. мед. навук. — 2012. — № 4. — С. 4–15.
12. Human CD141+ (BDCA-3)+ dendritic cells (DCs) represent a unique myeloid DC subset that cross-presents necrotic cell antigens / S.L. Jongbloed [et al.] // J. Exp. Med. — 2010. — Vol. 207, № 6. — P. 1247–1260.
13. Khaled, Y.S. Increased levels of granulocytic myeloid-derived suppressor cells in peripheral blood and tumour tissue of pancreatic cancer patients [Electronic resource] / Y.S. Khaled, B.J. Ammori, E. Elkord // J. Immunol. Res. — 2014. — Vol. 2014. — doi: 10.1155/2014/879897. — Mode of access: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3987936/pdf/JIR2014-879897.pdf>. — Date of access: 22.05.2014.
14. Comparative analysis of monocytic and granulocytic myeloid-derived suppressor cell subsets in patients with gastrointestinal malignancies / A. Duffy [et al.] // Cancer Immunol. Immunother. — 2013. — Vol. 62. — P. 299–307.
15. Increased production of immature myeloid cells in cancer patients: a mechanism of immunosuppression in cancer / B. Almand [et al.] // J. Immunol. — 2001. — Vol. 166, № 1. — P. 678–689.
16. Goh, C. Myeloid-derived suppressor cells: the dark knight or the joker in viral infections? / C. Goh, S. Narayanan, Y.S. Hahn // Immunol. Rev. — 2013. — Vol. 255. — P. 210–221.
17. Myeloid suppressor cells induced by hepatitis C virus suppress T cell responses through the production of reactive oxygen species / R. Tacke [et al.] // Hepatol. — 2011. — Vol. 55. — P. 343–353.
18. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells / C. Auffray [et al.] // Ann. Rev. Immunol. — 2009. — Vol. 27. — P. 669–692.
19. Gordon, S. Monocyte and macrophage heterogeneity / S. Gordon, P.R. Taylor // Nat. Rev. Immunol. — 2005. — Vol. 5, № 12. — P. 953–964.
20. Evaluation of a 12-color flow cytometry panel to study lymphocyte, monocyte, and dendritic cell subsets in humans / P. Autissier [et al.] // Cytometry. Part A. — 2010. — Vol. 77A. — P. 410–419.
21. Effects of Epstein-Barr virus on the development of dendritic cells derived from cord blood monocytes: an essential role for apoptosis / J. Wang [et al.] // Braz. J. Infect. Dis. — 2012. — Vol. 16, № 1. — P. 19–26.
22. Epstein-Barr Virus Promotes Interferon- α Production by Plasmacytoid Dendritic Cells / T.E. Quan [et al.] // Arthritis Rheum. — 2010. — Vol. 62, № 6. — P. 1693–1701.

SUBSETS OF PERIPHERAL BLOOD MONOCYTES, DENDRITIC CELLS AND MYELOID-DERIVED SUPPRESSOR CELLS IN THE PATIENTS WITH INFECTIOUS MONONUCLEOSIS

Hancharou A.Y., Davidovich G.M., Ramanava I.U., Duzh E.V.

Republican Research & Practical Center for Epidemiology & Microbiology, Minsk, Belarus

In the current investigation relative and absolute count of minor leukocyte subsets was assayed: CD1c⁺ and CD141⁺ myeloid dendritic cells, CD14⁺/CD16⁺ blood monocytes and monocytic and granulocytic

(CD15⁺ and CD33⁺) myeloid-derived suppressor cells in the patients with infectious mononucleosis compared with healthy controls. In patients with infectious mononucleosis statistically significant myeloid dendritic cell subset redistribution was determined with the increase of CD141⁺ cells, indicative of its role in the immunopathogenesis of the disease. The decrease of plasmacytoid dendritic cell count in the patients with mononucleosis was observed, suggesting migration to the lymphoid tissue or selective depletion. Monocytic myeloid-derived suppressor cell count was reduced in the patients with acute EBV-infection, explaining EBV-induced immune system hyperstimulation.

Keywords: infectious mononucleosis, immune status, dendritic cell, monocytes, myeloid-derived suppressor cells.

Поступила 10.07.2014

ТЯЖЕЛАЯ ВНЕБОЛЬНИЧНАЯ ПНЕВМОНИЯ: ПРИЧИНЫ, ФАКТОРЫ РИСКА, ПРОФИЛАКТИКА

Горбич О.А., Чистенко Г.Н.

Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь

Реферат. В настоящей работе проанализированы 12 параметров, оказывающих влияние на тяжесть течения клинической картины внебольничной пневмонии у детей. Представлены значимые факторы риска тяжелого течения внебольничной пневмонии среди госпитализированных в многопрофильную больничную организацию здравоохранения детей г. Минска.

Ключевые слова: внебольничная пневмония, факторы риска, дети.

Введение. На протяжении многих лет пневмония остается одной из наиболее актуальных проблем современной педиатрии как в Республике Беларусь, так и в мире. По мнению ряда экспертов, 10% случаев пневмонии характеризуется тяжелым, жизнеугрожающим течением и требует госпитализации в отделение интенсивной терапии и реанимации. На международном уровне все усилия медицинских работников направлены на снижение детской заболеваемости и смертности. Так, согласно Глобальному плану действий по профилактике пневмонии, ВОЗ и ЮНИСЕФ установили целью сплочение усилий по профилактике и лечению пневмонии, а также улучшение доступа к таким спасающим жизни мероприятиям, как вакцинация, грудное вскармливание и адекватная терапия [1]. Следует отметить значительные экономические потери, которые несет государство, обусловленные пневмонией, т. к. на долю этого заболевания приходится основной объем назначения антибактериальных препаратов у пациентов [2–5].

Цель работы — установление причин и факторов, оказывающих влияние на тяжесть течения клинической картины внебольничной пневмонии в Республике Беларусь, учитывая разнообразие данных о причинах и факторах риска развития тяжелой внебольничной пневмонии у детей на территории разных стран.

Материалы и методы. В настоящее проспективное исследование были включены 282 пациента в возрасте от 9 мес. до 17 лет, находившихся на лечении в УЗ «3-я городская детская клиническая больница» г. Минска, с диагнозом внебольничной пневмонии (ВП) за период с декабря 2011 г. по декабрь 2012 г. Диагноз устанавливался на основании стандартного клинического, рентгенологического, лабораторного обследования. Все пациенты, включенные в исследование, были разделены на 2 группы: пациенты со среднетяжелой клинической картиной течения заболевания (медиана возраста составила 6,0 лет (25–75 процентиля 3,0–11,0 лет)) и пациенты с тяжелой клинической картиной (медиана возраста составила 4,0 лет (25–75 процентиля 2,0–8,5 лет)). Тяжелое течение заболевания отмечалось у 44 (15,6%) пациентов, среднетяжелое течение — у 238 (84,4%) человек. Достоверность различий между 2 группами оценивалась с использованием критерия хи-квадрат (χ^2) для категориальных переменных и критерия Манна–Уитни (U) для количественных переменных. Различия между обеими группами были статистически значимыми ($p = 0,01$).

Для оценки факторов, оказывающих существенное влияние на тяжесть течения пневмонии, в 2 группах были проанализированы 12 параметров: возраст, пол, наличие физической активности, отсутствие грудного вскармливания, посещение организованного коллектива, количество членов семьи (скупенность), количество детей в семье, вредные привычки родителей, наличие различных ви-

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА АЛЛЕРГИЧЕСКОГО РИНИТА С ПОМОЩЬЮ ТЕСТА АКТИВАЦИИ БАЗОФИЛОВ (КЛИНИЧЕСКИЙ ПРИМЕР)

Романова И.В., Гончаров А.Е.
РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Минск, Беларусь

Реферат. Диагностика гиперчувствительности 1-го типа является актуальной задачей современной медицины в силу значительного увеличения удельного веса аллергических заболеваний в мировой популяции за последнее столетие. Существующие методы *in vivo*, кожные и провокационные пробы не всегда обладают достаточной надежностью результатов, при этом провокационные пробы могут привести к опасному осложнению в виде анафилактического шока. В последние десятилетия совершенствуются *in vitro* методы, преимуществом которых является расширения показаний для пациентов, характеризующихся безопасностью и возможностью стандартизации. В данной статье приведен клинический пример возможности использования нового перспективного *in vitro* метода диагностики аллергического ринита — теста активации базофилов.

Ключевые слова: тест активации базофилов, аллергический ринит, CD63.

Введение. Частота атопических заболеваний во всем мире неуклонно растет, что требует совершенствования методов диагностики [1]. Золотым стандартом диагностики гиперчувствительности к аэроаллергенам считается выполнение провокационных проб с причинным аллергеном, которые, однако, используются сравнительно редко в виду риска развития тяжелого системного осложнения — анафилактического шока [2]. В качестве стандартных дополнительных методов используют определение концентрации специфических IgE и проведение кожных проб при отсутствии противопоказаний [3].

В последнее время для диагностики аллергии представляют интерес клеточные *in vitro* тесты, в частности, тест активации базофилов (ТАБ). ТАБ основывается на выявлении экспрессии маркеров дегрануляции/или активации на поверхности базофилов в ответ на воздействие причинного аллергена [4]. При наличии сенсibilизации у пациента к тому или иному аллергену наблюдается дегрануляция базофилов. Идентификацию базофилов, а также оценку экспрессии маркеров активации и дегрануляции, самыми значимыми из которых являются молекулы LAMP-семейства (CD63, CD107a) [5], а также специфический маркер базофилов — молекула CD203c, осуществляют при помощи проточного цитометра. Данный метод диагностики привлекает своей (относительной) простотой, безопасностью для пациента, возможностью стандартизации метода.

Цель работы — описание возможности применения ТАБ для диагностики гиперчувствительности к аэроаллергенам.

Материалы и методы. *Кровь* для исследования забирали натощак из кубитальной вены. В качестве антикоагулянта использовали гепарин. Постановку исследуемых проб осуществляли в течение 2–4 ч от момента забора крови. *Аллергены.* В исследовании использовали диагностические аллергены производства «Sevapharma» (Чехия). Для исследования готовили разведения аллергенов в буферном растворе 1:200: береза, рожь, райграс, ольха, ежа, клещ домашней пыли, тимофеевка. *Постановка ТАБ.* В качестве отрицательного контроля выступала кровь в фосфатно-солевом буферном растворе без добавления аллергенов. Положительным контролем служил иономицин (1 мкг/мл) и ФМА (25 нг/мл). Одновременно проводили инкубацию исследуемых проб с аллергенами в разведении. Для усиления чувствительности метода осуществляли преинкубацию всех проб с интерлейкином (ИЛ)-3 (10 нг/мкл) в течение 15 мин при 37°C. Затем добавляли моноклональные антитела, конъюгированные с флуорохромами (CD63 (FITC), CD123 (PE), CD203c (APC)) и инкубировали пробы при комнатной температуре в темноте на протяжении 15 мин. Лизис эритроцитов осуществляли с помощью лизирующего раствора, содержащего хлорида аммония в качестве основного компонента. Клетки отмывали в фосфатно-солевом буферном растворе с добавлением EDTA и 0,1%-м азида натрия для остановки процесса дегрануляции базофилов и учитывали пробы на проточном цитометре. *Учет на проточном цитометре и результаты.* Учет данных проводили на проточном цитометре FACSCalibur (Becton Dickinson, США) с использованием программы «CellQuest» (BD, США). Данные анализировали при помощи программы «Weasel» версия 3.0.2 (WENI, Австралия).

Результаты и их обсуждение. Для демонстрации результатов приведен следующий клинический пример.

Краткий анамнез заболевания. Пациент Н., 33 года, с подросткового возраста ежегодно страдает сезонным аллергическим ринитом вначале весны и до конца июля. Перед проведением ТАБ пациент обследован аллергологом, оториноларингологом. Жалоб на типичные клинические проявления поллиноза не предъявлял. Из лекарственных средств для купирования симптомов аллергии принимает кестин (эбастин) — препарат второго поколения блокаторов H-1 гистаминовых рецепторов. Выполнены кожные пробы с диагностическими аллергенами. Результаты кожных проб: домашняя пыль «-» (отрицат.), шерсть домашних животных «-» (отрицат.), клещ домашней пыли «-» (отрицат.), береза «-» (отрицат.), ольха «-» (отрицат.), лещина «-» (отрицат.), вяз «-» (отрицат.), тополь «-» (отрицат.), клен «-» (отрицат.), дуб «-» (отрицат.), ежа «+++» (резкоположит.), овсяница луговая «+++» (положит. ср. степени.), рожь многолетняя «+++» (резкоположит.), тимфеевка «++++» (очень резкоположит.), мятлик луговой «-» (отрицат.), полынь обыкновенная «++» (положит.), райграс «++++» (очень резкоположит.).

Тест активации базофилов. Поскольку базофилы обладают небольшими размерами и невысокой гранулярностью, на цитограмме прямого и бокового светорассеяния базофилы расположены среди мононуклеаров периферической крови, преимущественно в регионе лимфоцитов (рисунок Г) [6]. Выделение базофилов среди клеток периферической крови проводили путем логического гейтирования с помощью молекул CD203c и CD123. Базофилы экспрессируют молекулу CD123, альфа-цепь рецептора к ИЛ-3, активация которой приводит к усилению процесса дегрануляции базофилов, а также повышению реактивности базофилов в ответ на действие аллергенов и неспецифических стимулов [7]. В периферической крови молекула CD203c экспрессируется исключительно на базофилах, при этом интенсивность экспрессии этой молекулы усиливается в процессе активации клеток [8]. Однако поскольку увеличение интенсивности экспрессии CD203c под действием активирующего сигнала наблюдается практически для всей популяции базофилов, корректное разграничение неактивированных CD203c^{lo} и активированных CD203c^{hi} клеток на проточном цитометре затруднено [9]. Поэтому данный маркер использовали исключительно для идентификации базофилов.

Отрицательный контроль свидетельствует о спонтанной активации клеток и позволяет разграничить уровень экспрессии молекул покоящихся клеток по сравнению с состоянием активации клетки. Положительный контроль используют для оценки способности базофилов дегранулировать в ответ на неспецифические стимулы (в настоящем исследовании иономицин и ФМА), что необходимо для исключения ложноотрицательных реакций.

Функциональный ответ базофилов на положительный контроль и аллергены определяли по усилению экспрессии маркера дегрануляции CD63. Молекула CD63 закорена в мембране гистаминсодержащих гранул покоящихся базофилов и в процессе дегрануляции интегрируется с поверхностной мембраной [10]. Преимущество маркера CD63 является в том, что он напрямую отражает дегрануляцию базофилов по принципу «все или ничего» [11].

При спонтанной активации базофилов (отрицательный контроль) процент экспрессии маркера дегрануляции CD63 составил 19% (рисунок Б), при активации базофилов (положительный контроль) — 81,2% (рисунок В). Отсутствие усиления интенсивности экспрессии CD203c в положительном контроле можно объяснить неспецифическим действием иономицина и ФМА.

Аллерген-индуцированную активацию клеток оценивали, как процент дегранулированных базофилов по отношению к проценту экспрессии молекулы CD63⁺ клеток в отрицательном контроле, выраженную в виде стимуляторного индекса (СИ). При достижении СИ выше 2,0 (двукратное увеличение экспрессии молекулы CD63) результат рассматривался диагностически значимым [12]. По данным выполненного теста активации базофилов можно предполагать наличие у пациента сенсибилизации к следующим аллергенам: рожь (CD63 — 68,3%, СИ = 3,6), райграс (CD63 — 71,7% СИ = 3,7), ежа (CD63 — 61,8% СИ = 3,3), тимфеевка (CD63 — 68,1% СИ = 3,6). Полученные результаты ТАБ соответствуют данным анамнеза и положительным результатам кожных проб, что может указывать на высокую специфичность и чувствительность метода.

Заключение. Тест активации базофилов в настоящее время весьма зарекомендовал себя в качестве дополнительного метода диагностики пищевой и респираторной аллергии, характеризуясь высокой чувствительностью и специфичностью. Данный метод представляется диагностически значимым для пациентов с атопией в том случае, когда выполнение провокационных исследований несет риск системных реакций, а для проведения кожных проб имеются противопоказания [13].

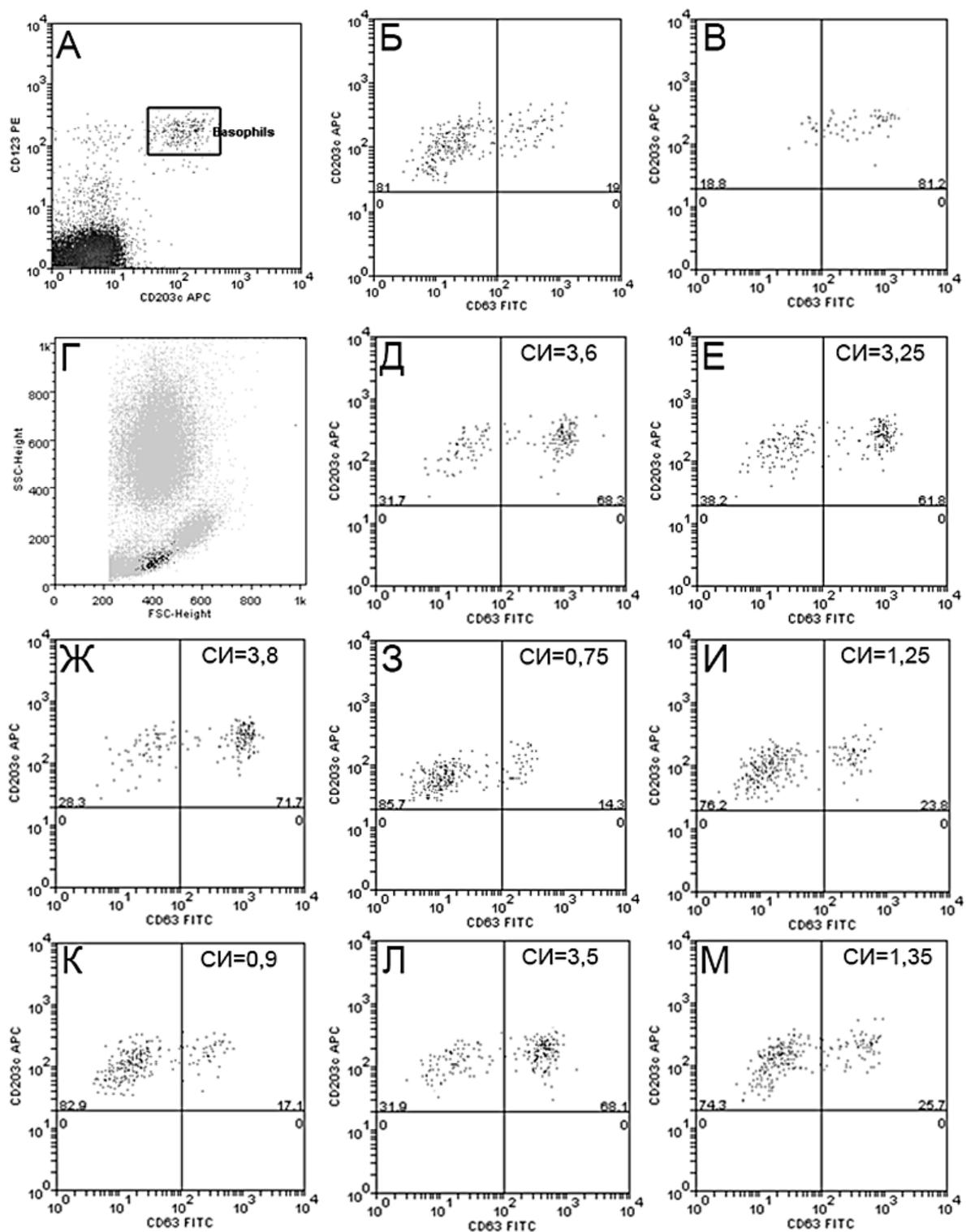


Рисунок — Анализ данных теста активации базофилов: А — выделение гейта базофилов по маркерам CD123⁺CD203c⁺; Б — оценка спонтанной активации базофилов (отрицательный контроль); В — активация базофилов под действием иономифина и ФГА (положительный контроль); Г — распределение базофилов среди клеток периферической крови по параметрам прямого и бокового светорассеяния (базофилы отображены черным цветом); Д-М — активация базофилов под действием различных аллергенов: Д — рожь, Е — ежа, Ж — райграс, З — ольха, И — клещ домашней пыли, К — перо птицы, Л — тимopheвка, М — береза

Литература

1. Research needs in allergy: an EAACI position paper, in collaboration with EFA / N.G. Papadopoulos [et al.] // Clin. Transl. Allergy. — 2012. — Vol. 2, № 1. — P. 1–21.
2. Allergen-specific nasal provocation testing: review by the rhinoconjunctivitis committee of the Spanish Society of Allergy and Clinical Immunology / M.T. Dordal [et al.] // J. Investig. Allergol. Clin. Immunol. — 2011. — Vol. 21, № 1. — P. 1–12.
3. Oppenheimer, J. Skin testing / J. Oppenheimer, H.S. Nelson // Ann. Allergy Asthma Immunol. — 2006. — Vol. 96. — P. 6–12.
4. Boumiza, R. The basophil activation test by flow cytometry: recent developments in clinical studies, standardization and emerging perspectives / R. Boumiza, A.L. Debard, G. Monneret // Clin. Mol. Allergy. — 2005. — Vol. 30, № 3. — P. 1–9.
5. Identification of CD13, CD107a, and CD164 as novel basophil-activation markers and dissection of two response patterns in time kinetics of IgE-dependent upregulation/ F. Hennersdorf [et al.] // Cell Res. — 2005. — Vol. 15, № 5. — P. 325–335.
6. Flow Cytometric Evaluation of Human Basophils / P. Gane [et al.] // Cytometry. — 1993. — Vol. 14, № 3. — P. 344–348.
7. Kurimoto, Y. The effect of interleukin 3 upon IgE-dependent and IgE-independent basophil degranulation and leukotriene generation / Y. Kurimoto, A.L. De Weck, C.A. Dahinden // Eur. J. Immunol. — 1991. — Vol. 21, № 2. — P. 361–368.
8. Basophil sensitivity through CD63 or CD203c is a functional measure for specific immunotherapy / S. Mikkelsen [et al.] // Clin. Mol. Allergy. — 2010. — Vol. 8. — P. 1–9.
9. Flow cytometry for basophil activation markers: The measurement of CD203c up-regulation is as reliable as CD63 expression in the diagnosis of cat allergy / A. Ocmant [et al.] // J. Immunol. Meth. — 2007. — Vol. 320, № 1–2. — P. 40–48.
10. CD63 antigen. A novel lysosomal membrane glycoprotein, cloned by a screening procedure for intracellular antigens in eukaryotic cells / M.J. Metzelaar [et al.] // J. Biol. Chem. — 1991. — Vol. 266, № 5. — P. 3239–3245.
11. The surface membrane antigen phenotype of human blood basophils / W. Füreder [et al.] // Allergy. — 1994. — Vol. 49, № 10. — P. 861–865.
12. Recombinant allergens promote expression of CD203c on basophils in sensitized individuals / A.W. Hauswirth [et al.] // J. Allergy Clin. Immunol. — 2002. — Vol. 110, № 1. — P. 102–109.
13. Potapińska, O. The usefulness of CD203c expression measurement on basophils after activation with grass pollen and Dermatophagoides pteronyssinus antigens. Preliminary study / O. Potapińska, E. Górska, A. Zawadzka-Krajewska // Pneumonol. Alergol. Pol. — 2009. — Vol. 77, № 2. — P. 138–144.

LABORATORY DIAGNOSIS OF ALLERGIC RHINITIS USING BASOPHIL ACTIVATION TEST (Clinical Example)

Ramanava I.U., Hancharou A.Y.

Republican Research & Practical Center for Epidemiology and Microbiology, Minsk, Belarus

Diagnosis of hypersensitivity type 1 is an actual problem of modern medicine because of the significant increase in the proportion of allergic diseases in the world population over the last century. Existing methods for *in vivo*, skin and provocative tests do not always have sufficient reliability of results, while provocative tests may lead to dangerous complications such as anaphylactic shock. In recent decades, *in vitro* methods have been improved, the advantage of which is the expansion of indications for patients characterized by safety and the possibility of standardization. This article provides a clinical example of the possibility of using a new promising method of diagnosis of allergic rhinitis *in vitro* — basophil activation test.

Keywords: basophil activation method, allergic rhinitis, CD63.

Поступила 10.047.2014

ВИРУСЫ ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА ВЫСОКОГО КАНЦЕРОГЕННОГО РИСКА И ДРУГИЕ БАКТЕРИАЛЬНЫЕ И ВИРУСНЫЕ ПАТОГЕНЫ ПРИ ФОНОВЫХ И ПРЕДРАКОВЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ УРОГЕНИТАЛЬНОГО ТРАКТА

Рубаник Л.В., Полещук Н.Н., Дейкун Д.А., Малиновская Ю.В.

РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Минск, Беларусь

Реферат. Проведено комплексное лабораторное обследование женщин с фоновыми (цервицит, эрозия шейки матки) и предраковыми (дисплазия) заболеваниями урогенитального тракта. Показано, что наряду с высокой частотой обнаружения вируса папилломы человека высокого канцерогенного риска (ВПЧ ВКР) одновременно детектируются такие патогены, как *S. trachomatis*, вирусы семейства *Herpesviridae*, *T. vaginalis*. Полученные данные свидетельствуют о важности дальнейшего изучения патогенеза микст-инфекций урогенитального тракта и определения наряду с ВПЧ ВКР других кофакторов ведущих к клеточной онкотрансформации.