

УДК [616.98:578.825.13]-092:612.017.1:57.083.3

О.Н. Коляда

Харьковский национальный медицинский университет

ОСОБЕННОСТИ ЦИТОКИНПРОДУЦИРУЮЩИХ СВОЙСТВ МОНОЦИТАРНОЙ ФРАКЦИИ МОНОНУКЛЕАРОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПРИ ВЭБ-ИНФЕКЦИИ

Установлена связь степени тяжести клинических проявлений ВЭБ-инфекции и продукции цитокинов моноцитами, что указывает на непосредственное участие этих клеток в противовирусной защите. Показано, что повышение уровня таких цитокинов, как IL-1RA, IL-12p40 и IL-12 является отрицательным прогностическим признаком.

Ключевые слова: моноцитарная фракция мононуклеаров, ВЭБ-инфекция, цитокины.

Несмотря на достигнутые успехи в изучении иммунопатогенеза инфекционного мононуклеоза, механизмы развития иммунодефицитных состояний еще недостаточно изучены [1, 2]. По мнению большинства авторов, основными элементами противовирусной защиты являются система интерферонов, натуральные киллеры и специфические противовирусные Т-лимфоциты [3, 4]. В последние годы значительное внимание уделяется роли клеток моноцитарного ряда, осуществляющих положительный противовирусный эффект как напрямую, так и опосредованно, через цитокинзависимую кооперацию иммунокомпетентных клеток. Одной из важнейших функций моноцитов является их способность дифференцироваться в макрофаги и ДК [5–8].

Целью работы было изучение особенностей продукции клетками моноцитарной фракции мононуклеаров периферической крови цитокинов в патогенезе вирусной инфекции.

Материал и методы. В исследовании приняли участие 97 пациентов в возрасте от 18 до 29 лет с клиническими проявлениями иммунодефицитных нарушений, которые классифицируются по МКБ-10 как «другие иммунодефицитные нарушения уточненные» (D 84.8). Пациентов обследовали в лаборатории клинической иммунологии и аллергологии ГУ «НАМНУ». Их разделили на две группы в зависимости от степени тяжести клинических симптомов: 1-я группа – с отно-

сительно легкой степенью заболевания (n=51); 2-я – пациенты со средней степенью тяжести течения болезни (n=35). Контрольную группу составили 25 практически здоровых людей.

Выделение мононуклеарных клеток проводили на градиенте плотности фиколлаверографина ($\rho=1,077$ г/см³) и довели до концентрации $5 \cdot 10^6$ /мл, инкубировали в стерильных планшетах в полной среде культивирования в течение 2 часов при температуре 37 °С и атмосфере 5 % CO₂. Выделение клеток моноцитов проводили путем отбора адгезированной фракции. Затем их культивировали в трех вариантах: 1) спонтанно – без добавления индуктора; 2) с добавлением ЛПС *E.coli* производства Serva (США) в концентрации 1 мкг/мл; 3) с добавлением рекомбинантного человеческого ИФН- α в концентрации 10 ед/мл. Содержание цитокинов ФНО- α , ИЛ-1 β , ИЛ-1RA, ИЛ-10 определяли иммуноферментным методом с использованием тест-систем производства ЗАО «Вектор-Бест» (Россия), ИЛ-12p70/p40-тест-систем производства eBioScience (США).

Полученные цифровые данные статистически обрабатывали с использованием t-критерия Стьюдента.

Результаты и их обсуждение. Результаты исследования продукции цитокинов клетками моноцитарной фракции периферической крови представлены в таблице.

Уровень спонтанной продукции ФНО- α моноцитами после 24-часовой инкубации

© О.Н. Коляда, 2016

Продукция цитокинов клетками моноцитарной фракции периферической крови пациентов с различной степенью тяжести ВЭБ-инфекции ($M \pm m$)

Показатель, пг/мл		1-я группа (легкая степень тяжести)	2-я группа (средняя степень тяжести)	Контроль
ФНО- α	С	78,3 \pm 8,6	63,7 \pm 5,3 ¹⁾	89,1 \pm 10,3
	ЛПС	201,2 \pm 44,6	207,8 \pm 69,6	266,5 \pm 57,1
	ИФН	96,2 \pm 7,2 ^{1,2)}	75,5 \pm 10,9 ²⁾	77,5 \pm 9,7
ИЛ-1 β	С	130,2 \pm 14,8 ^{1,2)}	196,5 \pm 31,7 ^{1,2)}	54,4 \pm 6,7
	ВПГ	257,9 \pm 23,9 ^{1,2)}	342,2 \pm 28,6 ^{1,2)}	187,7 \pm 14,1
	ИФН	163,2 \pm 19,4 ^{1,2)}	230,6 \pm 31,2 ^{1,2)}	67,3 \pm 8,1
ИЛ-1RA	С	1027,4 \pm 244,6 ²⁾	2246,1 \pm 161,5 ^{1,2)}	1237,2 \pm 112,4
	ВПГ	1108,2 \pm 159,9 ^{1,2)}	3780,9 \pm 181,6 ^{1,2)}	2576,7 \pm 137,1
	ИФН	1044,5 \pm 115,7 ^{1,2)}	1989,1 \pm 211,4 ^{1,2)}	1405,1 \pm 162,2
ИЛ-10	С	1,6 \pm 0,2 ²⁾	9,3 \pm 1,1 ^{1,2)}	1,4 \pm 0,4
	ВПГ	2,8 \pm 0,2 ²⁾	12,5 \pm 1,6 ^{1,2)}	2,1 \pm 0,3
	ИФН	2,1 \pm 0,3 ²⁾	12,9 \pm 1,4 ^{1,2)}	1,5 \pm 0,2
ИЛ-12p70	С	31,5 \pm 3,1 ²⁾	31,5 \pm 3,1 ²⁾	27,3 \pm 2,9
	ВПГ	112,4 \pm 15,1 ^{1,2)}	180,5 \pm 8,7 ^{1,2)}	157,7 \pm 14,4
	ИФН	36,8 \pm 4,2	45,7 \pm 4,9 ¹⁾	31,1 \pm 3,3
ИЛ-12p40	С	469,4 \pm 51,3 ^{1,2)}	1769,8 \pm 66,7 ^{1,2)}	988,5 \pm 141,1
	ВПГ	932,8 \pm 155,3 ^{1,2)}	3811,5 \pm 195,7 ^{1,2)}	2807,1 \pm 254,4
	ИФН	513,1 \pm 61,2 ^{1,2)}	1640,2 \pm 212,4 ^{1,2)}	870,2 \pm 91,4

Примечания: 1. С – спонтанная продукция.

2. $p < 0,05$ – ¹⁾ различия достоверны при сравнении с контрольной группой; ²⁾ различия достоверны при сравнении с 1-й и 2-й группами.

у пациентов с более тяжелым течением заболевания был снижен по сравнению с уровнем в контрольной группе и в группе с более легким течением. При использовании в качестве индукторов ЛПС и рекомбинантного ИФН- α продукция ФНО- α не различалась.

Спонтанная продукция моноцитами ИЛ-10 у всех пациентов была достоверно выше, чем в контроле. Достоверное увеличение индуцированной продукции ИЛ-10 под влиянием ЛПС и ИФН- α было выявлено только у пациентов с более тяжелой степенью течения заболевания (таблица).

Спонтанная продукция моноцитами ИЛ-1 β по сравнению с контролем была достоверно повышена во всех группах: в 1-й группе – в 3,6 раза, во 2-й – также в 3,6 раза. Увеличение продукции ИЛ-1 β в ответ на стимуляцию ЛПС наблюдалось у всех пациентов с ВЭБ-инфекцией: индекс стимуляции ИЛ-1 β в 1-й и 2-й группах составлял 2,0 и 1,7, в контрольной группе – 3,5. При этом стимуляция ИФН- α как у пациентов 1-й, так и 2-й групп увеличивала уровень ИЛ-1 β в 3,6 раза.

Регуляция активности ИЛ-1 β осуществляется растворимым рецепторным антагонистом ИЛ-1, способным конкурентно связываться с рецептором к ИЛ-1. Не обладая провоспалительной активностью, ИЛ-1RA

действует как естественный ингибитор ИЛ-1 β . Соотношение уровня продукции ИЛ-1 β и ИЛ-1RA клетками моноцитарной фракции МНК является важным маркером активности воспалительного процесса [9].

У пациентов со средней степенью тяжести заболевания уровень спонтанной продукции растворимого антагониста ИЛ-1 – ИЛ-1RA во 2-й группе значительно увеличивался. Стимуляция ЛПС не вызывала достоверного повышения уровня ИЛ-1RA во всех группах. Однако использование в качестве индуктора ИФН- α приводило к увеличению индуцированной продукции ИЛ-1RA во всех группах. Наибольшее значение этой продукции было выявлено у пациентов с более тяжелой степенью заболевания.

При оценке продукции ИЛ-12 рекомендовано учитывать не только продукцию димера ИЛ-12p70, но и продукцию субъединицы ИЛ-12p40, синтезируемой преимущественно клетками моноцитарно-макрофагальной системы. Выявлено, что у пациентов 2-й группы уровень спонтанной продукции ИЛ-12p70 был в 1,9 раза выше, чем в контроле. У пациентов с более тяжелым течением на фоне повышенной относительно контроля и 1-й группы продукции ИЛ-12p70 выявлена повышенная продукция субъединицы

ИЛ-12p40 в 3,8 раза выше, чем в 1-й группе, и в 1,8 раза выше, чем в контроле ($p < 0,05$).

Продукция ИЛ-12p70, индуцированная антигеном ЛПС, в 1-й группе была снижена относительно контроля в 1,4 раза, а во 2-й группе, напротив, выше, чем в контроле в 1,2 раза ($p < 0,05$). Уровни ИФН- α -индуцированной продукции как ИЛ-12p70, так и ИЛ-12p40 не имели отличий от уровня спонтанной продукции во всех группах.

Таким образом, выявлено, что спонтанный и стимулированный синтез ИЛ-12p70 выше у пациентов с более тяжелой формой течения заболевания, что сочетается с увеличенной относительно показателя 1-й группы продукцией ИЛ-10 и повышенным синтезом субъединицы ИЛ-12p40. В связи с тем, что ИЛ-12 реализует свои эффекты, связываясь с ИЛ-12RA, дисбаланс в продукции субъединиц ИЛ-12 может приводить к блокированию эффектов ИЛ-12p70 вследствие конкурентного связывания ИЛ-12RA с ИЛ-12p40.

Согласно современным представлениям о роли ИЛ-12 в противовирусном иммунитете, высокий уровень продукции ИЛ-12 положительно влияет на поляризацию в направлении Th1 (12). Однако у пациентов с более тяжелой формой заболевания на фоне повышенной относительно 1-й группы продукции ИЛ-12 выявлена гиперпродукция

субъединицы ИЛ-12p40. Дисбаланс в продукции субъединиц ИЛ-12 может приводить к блокированию эффектов ИЛ-12p70 вследствие конкурентного связывания ИЛ-12 с ИЛ-12p40, что ведет к блокированию эффектов ИЛ-12 и смещению иммунного ответа в сторону Th2. В то же время у пациентов 2-й группы наблюдается повышенная относительно 1-й группы продукция ИЛ-10.

Таким образом, показано, что развитие более тяжелой формы ВЭБ-инфекции сопровождается снижением уровня ФНО- α , повышением спонтанной и индуцированной продукции ИЛ-10 (у 76 % больных), а также ИЛ-12 и ИЛ-1 β клетками моноцитарной фракции мононуклеаров периферической крови (в 85 % случаев). При этом у 67 % пациентов выявлен дисбаланс продукции ИЛ-12p70/ИЛ-12p40, а у 43 % – повышенная продукция растворимого антагониста ИЛ-1. Блокировка эффектов ИЛ-12 и ИЛ-1 β вследствие конкурентного связывания ИЛ-12p40 и ИЛ-1RA с соответствующими рецепторами рассматривается как важный механизм нарушения межклеточной кооперации, способный вызывать смещение иммунного ответа в сторону Th2, что может вести к снижению эффективности противовирусной защиты и способствовать более тяжелому течению ВЭБ-инфекции.

Литература

1. Особливості клінічного перебігу інфекційного мононуклеозу в дорослих / Л.Ю. Шевченко, Т.В. Покровська, В.І. Бельдій, Т.І. Алексанян // Інфекційні хвороби. – 2005. – № 3. – С. 26–30.
2. Борисов А.Г. Особенности иммунного реагирования при вирусных инфекциях / А.Г. Борисов, А.А. Савченко, И.В. Кудрявцев // Инфекция и иммунитет. – 2015. – Т. 5, № 2. – С. 148–156.
3. Титов Л.П. Противовирусный иммунитет: молекулярно-клеточные механизмы, закономерности развития и иммунопатология / Л.П. Титов, И.А. Карпов // Белорусский медицинский журнал. – 2008. – № 3. – С. 28–35.
4. Braciale T.J. Immunity to viruses / T.J. Braciale, Y.S. Hahn // Immunol Rev. – 2013. – Vol. 255, № 1. – P. 5–12.
5. Janeway's Immunobiology. 8th ed. / K. Murphy, P. Travers, M. Walport, C. Janeway. – N.Y.: Garland Science, 2012. – 888 p.
6. Development of monocytes, macrophages and dendritic cells / F. Geissmann, M.G. Manz, S. Jung et al. // Science. – 2010. – Vol. 327(5966). – P. 656–661.
7. Gordon S. Monocyte and macrophage heterogeneity / S. Gordon, P.R. Taylor // Nature Reviews Immunology. – 2005. – Vol. 5. – P. 953–964.
8. Leon B. Monocyte-derived dendritic cells in innate and adaptive immunity / B. Leon, C. Ardavin // Immunology and Cell Biology. – 2008. – Vol. 86. – № 4. – P. 320–324.
9. Mucosal imbalance of IL-1 and IL-1 β receptor antagonist in inflammatory bowel disease. A novel mechanism of chronic intestinal inflammation / V. Casini-Raggi, L. Kam, Y.J. Chong et al. // J. Immunol. – 1995. – Vol. 15, № 5. – P. 2434–2440.
10. Система фактора некроза опухоли а и его рецепторов в иммунопатогенезе персистентных вирусных инфекций / А.П. Зима, Н.В. Рязанцева, В.В. Новицкий и др. // Иммунология. – 2007. – Т. 28, № 6. – С. 357–361.

11. Направленная коррекция цитокиновой регуляторной сети при вирусных инфекциях / М.В. Мезенцева, Р.Я. Подчерняева, Л.В. Урываев // Вестник Рос. акад. естественных наук. – 2011. – № 1. – С. 9–13.

12. Дисбаланс иммунорегуляторных Th1- и Th2-цитокинов при персистентных вирусных инфекциях / И.О. Наследникова, Н.В. Рязанцева, В.В. Новицкий и др. // Медицинская иммунология. – 2007. – Т. 9, № 1. – С. 53–60.

О.М. Коляда

**ОСОБЛИВОСТІ ЦИТОКІНПРОДУКУЮЧИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ МОНОЦИТАРНОЇ ФРАКЦІЇ
МОНОНУКЛЕАРІВ ПЕРИФЕРИЧНОЇ КРОВІ ПРИ ВЕБ-ІНФЕКЦІЇ**

Встановлено зв'язок ступеня тяжкості клінічних проявів ВЕБ-інфекції та продукції цитокинів моноцитами, що вказує на безпосередню участь цих клітин в протівірусному захисті. Показано що підвищення рівнів таких цитокинів, як ІЛ-1РА, ІЛ-12р40 та ІЛ-12, є негативною прогностичною ознакою.

Ключові слова: моноцитарна фракція мононуклеарів, ВЕБ-інфекція, цитокини.

О.Н. Kolyada

**FEATURES OF CYTOKINE PRODUCTION PROPERTIES OF MONOCYTIC FRACTION OF MONO-
NUCLEAR CELLS OF PERIPHERAL BLOOD IN EBV-INFECTIO**

There have been found correlations between severity of clinical manifestations of EBV-infection and the production of cytokines by monocytes, which indicates that these cells directly involved to the antiviral defense. Increasing of the level of such cytokines as IL-1RA, IL-12p40 and IL-12 is a negative prognostic sign.

Key words: monocytic fraction of peripheral blood mononuclear cells, EBV-infection, cytokines.

Поступила 08.04.16