

А. Е. Гончаров¹, Е. Г. Рында¹, В. С. Гурлев^{1, 2}, С. О. Вельгин^{1, 3}

ПОИСК IN VITRO НОВЫХ БИОМАРКЕРОВ ДЛЯ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКИ ЭТИОЛОГИИ ОСТРЫХ ИНФЕКЦИЙ

РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Минск¹,
УО «Белорусский государственный медицинский университет»²,
Городская клиническая инфекционная больница, Минск³

Изучена степень изменений экспрессии паттерн-ассоциированных и схожих по функции молекул нейтрофилами и моноцитами периферической крови под влиянием убитых Грам(+) и Грам(-) бактерий и их компонентов. Установлено, что даже в минимальной концентрации исследованные бактерии и их компоненты оказывали значимое влияние на экспрессию молекул CD11b, CD32, CD35, CD62L, CD64 и CD88 нейтрофилами и моноцитами крови, что обосновывает их использование в разработке метода дифференциальной диагностики бактериальной и вирусной этиологии острых инфекций. Сравнительный анализ индекса активации клеток позволил выбрать наиболее перспективные биомаркеры, определение которых будет проводиться на клинических образцах.

Ключевые слова: биомаркеры, маркеры активации, проточная цитометрия, нейтрофилы, моноциты.

A. E. Goncharov, E. G. Rynda, V. S. Gurlev, S. O. Velgin

SEARCH OF IN VITRO OF NEW BIOMARKERS FOR DIFFERENTIAL DIAGNOSTICS OF THE AETIOLOGY OF SHARP INFECTIONS

The extent of changes in the expression of pattern-associated receptors and molecules similar in function by peripheral blood neutrophils and monocytes under the influence of inactivated gram-positive and gram-negative bacteria and its components was studied. It was established that even in the minimum concentration, the studied bacteria and its components exerted a significant influence on the expression of the CD11b, CD32, CD35, CD62L, CD64 and CD88 molecules by blood neutrophils and monocytes, which supports its application in the development of a method for differential diagnosis of the bacterial and viral etiology of acute infections. Comparative analysis of cell activation index allowed to choose the most promising biomarkers, to determine using clinical samples.

Keywords: biomarkers, activation markers, flowing tsitometriya, neutrophils, monocytes.

Проблема дифференциальной диагностики бактериальной и вирусной этиологии острых инфекций на раннем амбулаторном или стационарных этапах, является чрезвычайно актуальной для здравоохранения. Используемые в настоящее время лабораторные методы подтверждения этиологии инфекционных заболеваний, несмотря на постоянное совершенствование, имеют ряд ограничений, связанных с аналитическими характеристиками тест-систем и невозможностью получения результатов в приемлемые сроки. Так, например, известны методы дифференциальной диагностики бактериальных и вирусных менингитов на основе определения содержания С-реактивного белка (СРБ) [2] в сыворотке крови, матриксной металлопротеиназы-9 (ММР-9) и растворимой формы

CD54 (sICAM-1) в ликворе [9], прокальцитонина (ПКТ) в сыворотке методом иммунохроматографии [1, 3]. Часто используют комбинацию этих методов [3]. Большинство из указанных методов обладают рядом недостатков, среди которых невысокая чувствительность и специфичность, невозможность получения результатов в приемлемые сроки. Некоторые из методов применимы лишь в случае инфекций, вызванных конкретным возбудителем, либо в случае инфекции с определенной локализацией. В связи с этим, требуется проведение дальнейшего научного поиска для разработки и внедрения высокоинформативных экспресс-тестов нового поколения, которые позволят в первые часы после поступления пациента в стационар осуществлять дифференциальную диагностику

между бактериальной и вирусной этиологией инфекционного заболевания.

Известно, что компоненты бактерий активируют нейтрофилы и моноциты (равно как и другие антигенпредставляющие клетки) посредством взаимодействия с внутриклеточными и поверхностными паттерн-распознающими рецепторами (ППР). В настоящее время выделяют 5 основных групп ППР: toll-like-рецепторы (TLRs), рецепторы лектинового типа (CLRs), NOD-рецепторы (NLRs), RIG-I-рецепторы (RLRs) и AIM2-подобные рецепторы (ALRs) [6]. Помимо ППР, активация нейтрофилов и моноцитов бактериями сопровождается значительным усилением экспрессии Fc-рецепторов к IgG (CD16, CD32 и CD64), рецепторов к компонентам системы комплемента CR1 (CD35), C5aR1 (CD88), молекул гистосовместимости [7–8]. В то же время, молекулы, распознающие компоненты вирусов представлены на нейтрофилах крайне слабо. Свойство нейтрофилов и моноцитов активироваться под действием компонентов бактерий, и не отвечать значимой активацией в ответ на стимуляцию вирусами, по всей видимости, можно использовать на практике в диагностических целях.

Цель исследования: используя метод проточной цитометрии, изучить характер и степень изменения экспрессии основных маркеров активации нейтрофилов и моноцитов под действием бактерий и их компонентов, с целью отбора показателей, экспрессия которых может быть использована в дальнейшем в диагностических целях.

Материалы и методы. Объектами для *in vitro* исследований служили 24 образца крови доноров и здоровых добровольцев. *Постановку эксперимента* проводили не позднее 6 часов после забора крови. К крови в количестве 500 мкл добавляли следующие активаторы и контроли: 1) отрицательный контроль (OK) – фосфатный буферный раствор (DPBS); 2) положительный контроль (ПК) – 0,1 мкг/мл LPS *E. Coli* (Sigma-Aldrich, США); 3) *Lactobacillus acidophilus* (Грамм+) – 10^6 /мл; 4) *Escherichia coli* М 17 (Грамм-) – 10^6 /мл; 5) клеточные стенки лактобактерий (0,1 мкг/мл); 6) бактериальные «тени» *E. coli* – 0,1 мкг/мл; 7) вирусы гриппа А и В из вакцины «Ультравак», инактивированные нагреванием до 56 °С на протяжении 30 мин. – в разведении 1/20. Доводили объем взвеси до 1 мл питательной средой RPMI-1640 и инкубировали

взвесью на протяжении 45 минут при температуре 37 °С. После инкубации образцы крови в количестве 100 мкл инкубировали с моноклональными антителами, лизировали эритроциты и проводили учет на проточном цитометре BD FACSCalibur. Регистрировали как процент экспрессии маркеров, так и относительную интенсивность флуоресценции (ОИФ), характеризующую интенсивность экспрессии молекулы клетками. Моноклональные антитела, использованные в работе: CD11b (APC), клон MEM-174; CD32 (PE), клон 2E1; CD35 (PE), клон E11; CD62L (PE), клон LT-TD180; CD64 (APC), клон 10.1; CD88 (APC), клон S5/1; CD282 (PE), клон TL2.1; CD284 (APC), клон HTA125, HLA-ABC (FITC), клон B9.12.1, HLA-DR (FITC), клон Immu-357. Данные анализировали при помощи программы Weasel [4]. Статистическую обработку полученных данных проводили в программе Statistica версии 12 (StatSoft, США) [5]. Значения показателей представлены в виде медианы с интерквартильным размахом в виде 25-й и 75-й перцентилей. Учитывая отсутствие в большинстве представленных выборок нормального распределения (согласно W-критерия Шапиро-Вилка), для сравнения групп данных использовали U-критерий Манна-Уитни. В качестве критерия достоверности различий показателей принимали уровень значимости $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Экспрессия рецепторов компонентов системы комплемента CD35 и CD88. Показано, что нейтрофилы характеризуются 100%-ой экспрессией обеих молекул CD35 и CD88 как в неактивированном состоянии, так и при активации бактериальными компонентами. В то же время, интенсивность экспрессии этих молекул статистически достоверно возросла после инкубации крови как с убитыми бактериями, так и с компонентами микроорганизмов (рисунок 1). Экспрессия молекулы CD35 моноцитами не различалась значимо между клетками, инкубированными с отрицательным контролем, исследованными бактериями и их компонентами ($p = 0,28$). Так, в отрицательном контроле медианные значения экспрессии составляли 96,1(94,2–96,6)%, в положительном – 97,9(97,6–98,0)%, а в исследованных образцах микроорганизмов и их производных – варьировали от 96,3% до 98,1%. Интенсивность экспрессии существенно усиливалась после инкубации с микроорганизма-

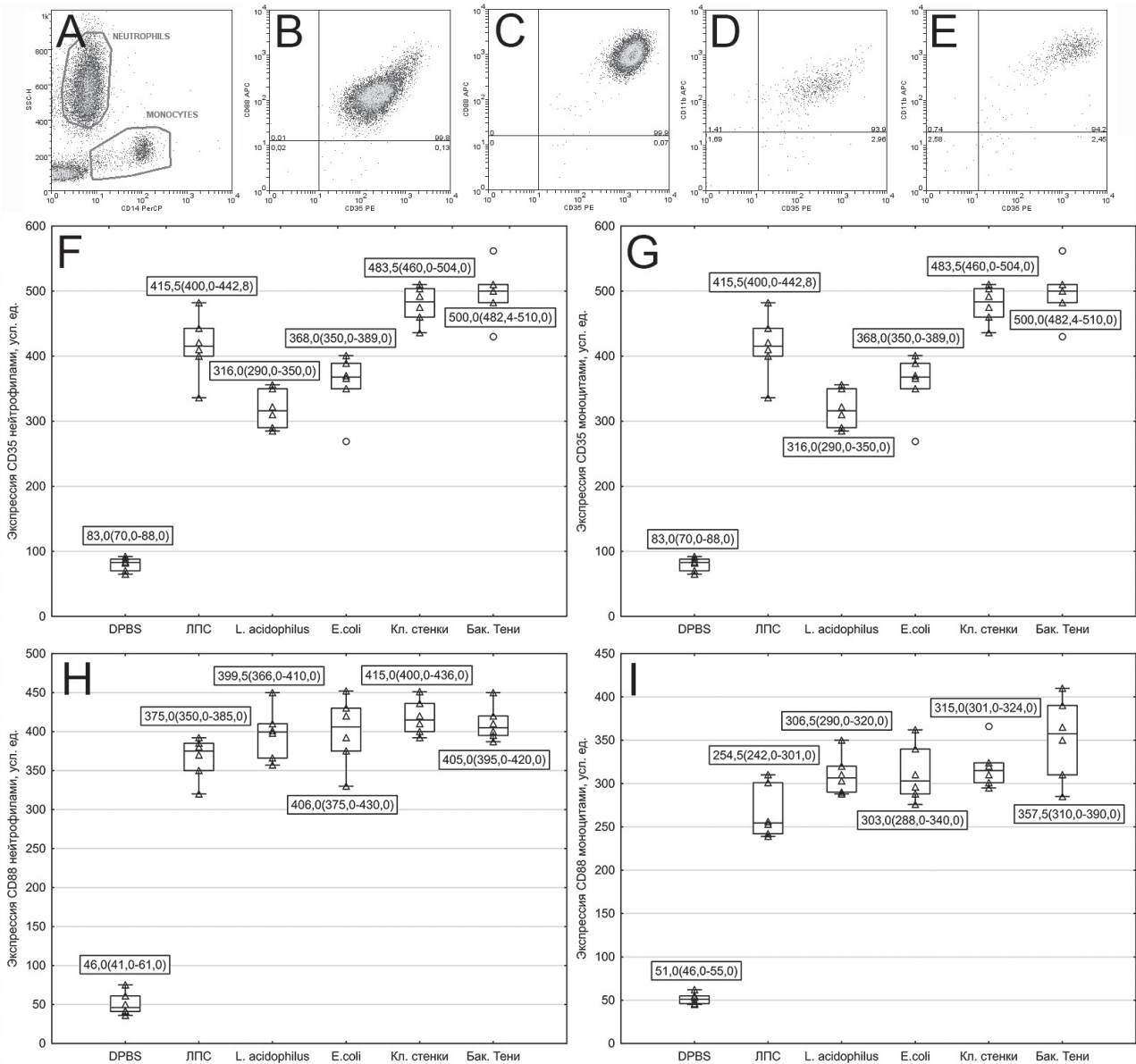


Рис. 1. Экспрессия молекул CD35 и CD88

- A – гейтирование CD14⁺ моноцитов и CD14^{-/lo} нейтрофилов крови
- B – Экспрессия молекул CD35 и CD88 нейтрофилами (контроль)
- C – Экспрессия молекул CD35 и CD88 нейтрофилами (E.coli)
- D – Экспрессия молекул CD35 и CD88 моноцитами (контроль)
- E – Экспрессия молекул CD35 и CD88 моноцитами (E.coli)
- F – Интенсивность экспрессии молекулы CD35 нейтрофилами
- G – Интенсивность экспрессии молекулы CD35 моноцитами
- H – Интенсивность экспрессии молекулы CD88 нейтрофилами
- I – Интенсивность экспрессии молекулы CD88 моноцитами

ми ($p < 0,001$). Экспрессия CD88 моноцитами крови, инкубированными с микроорганизмами и их компонентами, не отличалась статистически достоверно от отрицательного контроля (OK – 93,8(93,3–94,0)%, ЛПС – 93,7(92,8–94,7)%, лактобактерии – 93,1(92,3–94,2)%, бактериальные тени – 93,7(92,6–94,0)%, $p = 0,93$). Интен-

сивность экспрессии CD88 нейтрофилами усиливалась при инкубации с ЛПС и исследуемыми компонентами микроорганизмов, в то же время, достоверных различий в интенсивности экспрессии под действием различных препаратом выявлено не было ($p = 0,051$). Интенсивность экспрессии CD88 моноцитами достоверно уве-

личивалась при инкубации со всеми микробными препаратами, однако степень изменения экспрессии была разной. Наибольшую стимулирующую активность в отношении экспрессии CD88 моноцитами проявили бактериальные тени *E. Coli*, а наименьшую – ЛПС.

Экспрессия рецепторов к Fc-фрагментам иммуноглобулинов CD32 и CD64. Экспрессия CD32 как на моноцитах, так и на нейтрофилах приближалась к 100%. Статистически значимых различий в количестве CD32⁺ нейтрофилов ($p = 0,30$) и моноцитов ($p = 0,24$) не выявлено во всех исследованных пробах. На рисунке 2 представлены цитограммы светорассеяния, иллюстрирующие экспрессию CD32 и CD64 нейтрофилами и моноцитами. Интенсивность экспрессии CD32 нейтрофилами достоверно усиливалась при стимуляции всеми из апробированных микробных компонентов (различия в сравнении с ОК – $p < 0,0021$), однако при этом, интенсивность экспрессии не отличалась между различными микроорганизмами и их компонентами ($p = 0,051$). Интенсивность экспрессии

CD32 моноцитами под влиянием всех микробных компонентов также достоверно отличалась от ОК (рисунок 2). Экспрессия CD64 нативными нейтрофилами невелика и составляет 3,6(1,5–5,6)%. При активации экспрессия значительно возрастает, медианные значения при воздействии различных микробных компонентов составляют от 41,8% до 58,5% (т.е. не менее, чем в 10 раз). В то же время, интенсивность экспрессии даже в процессе активации усиливается не так значительно, в 2–3 раза. Моноциты, особенно, «классические», конститутивно экспрессируют молекулу CD64. Медианные значения экспрессии составляют от 95,1% до 95,9% и не меняются достоверно в процессе активации клеток. Интенсивность экспрессии усиливается при воздействии компонентов микроорганизмов, при этом медианные значения показателя увеличиваются в 2,0–2,5 раза (рисунок 2).

Экспрессия TLR-рецепторов CD282 и CD284. Относительное содержание CD282⁺ нейтрофилов ($p = 0,06$), так и интенсивность экспрессии этой молекулы ($p = 0,097$), не различались ста-

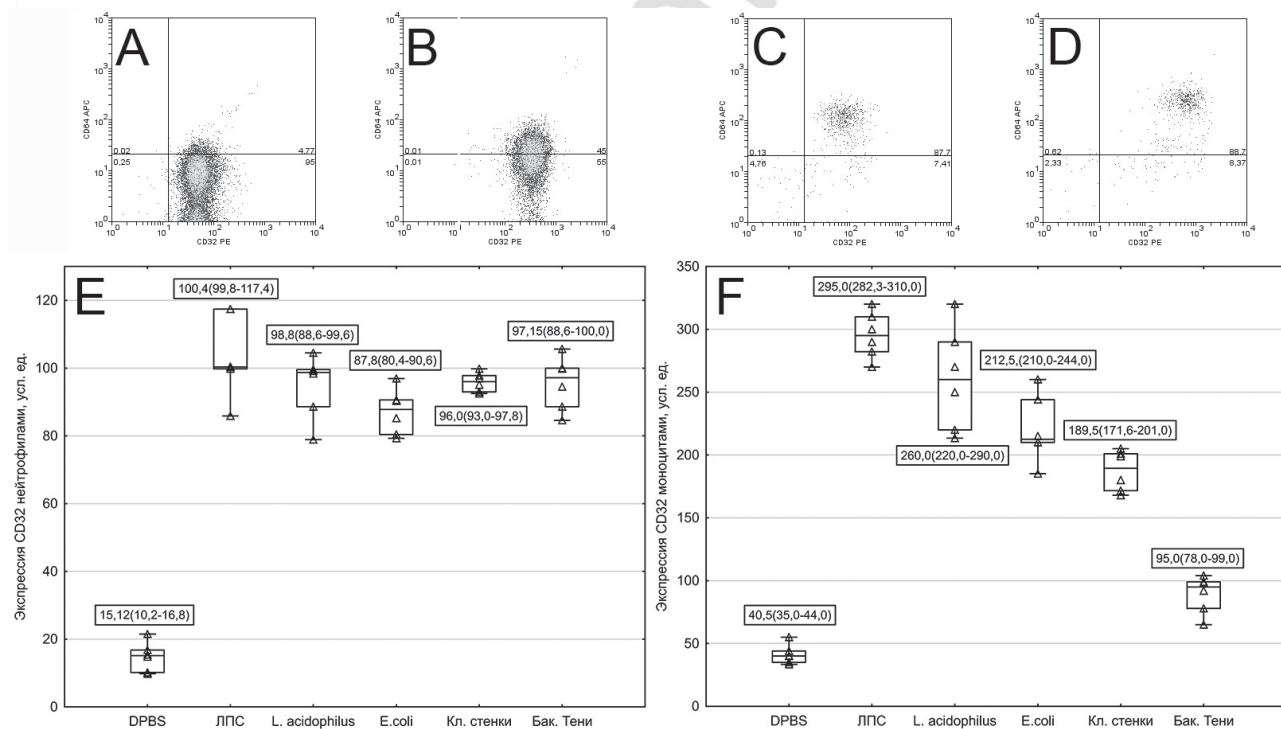


Рис. 2. Экспрессия молекул CD32 и CD64 лейкоцитами:

- A – график экспрессии CD32/CD64 нейтрофилами (контроль)
- B – график экспрессии CD32/CD64 нейтрофилами (*E. Coli*)
- C – график экспрессии CD32/CD64 моноцитами (контроль)
- D – график экспрессии CD32/CD64 моноцитами (*E. Coli*)
- E – интенсивность экспрессии CD32 нейтрофилами
- F – интенсивность экспрессии CD32 моноцитами

статистически достоверно в ОК, ПК и при воздействии микробными препаратами. Медианные значения процентного содержания CD282⁺ нейтрофилов колебались от 17,5% до 25,2%, а интенсивность экспрессии – от 2,5% до 4,7%. Экспрессия молекулы CD282 моноцитами составляла от 94,6% до 96,0%, достоверных изменений под влиянием микробных препаратов не выявлено. Интенсивность экспрессии CD282 моноцитами в ОК и при стимуляции микробными компонентами достоверно отличалась ($p < 0,002$). Интенсивность экспрессии молекулы CD284 как нейтрофилами ($p = 0,418$), так и моноцитами ($p = 0,173$) не изменилась достоверно после инкубации с микробными препаратами. В тот же время, количество CD284⁺ клеток достоверно увеличивалось в 2–3 раза в зависимости от микробного стимула (таблица 1).

Экспрессия селектинов и интегринов. Установлено, что более 95% моноцитов и нейтрофилов экспрессируют молекулу CD11b в исходном состоянии и при активации. Интенсивность экспрессии молекул CD11b (таблица 2) нейтрофилами и моноцитами существенно, более чем в 5 раз, усиливалась при активации (CD11b на нейтрофилах, контроль – 37,1(30,2–42,5) усл. ед,

ЛПС – 415,6(380,3–490,6) усл. ед., клеточные стенки лактобактерий – 581,4(500,6–711,6) усл. ед.). В то же время, экспрессия молекулы CD62L нейтрофилами и моноцитами уменьшалась в процессе активации, снижался как процент CD62L⁺ клеток (таблица 10), так и интенсивность экспрессии (таблица 3). Цитограммы флуоресценции, иллюстрирующие изменения иммунофенотипа нейтрофилов в процессе активации, представлена на рисунке 3. Выявлена обратная корреляционная связь между экспрессией молекулы CD11b и CD62L нейтрофилами и моноцитами ($R = -0,79$, $p = 0,001$).

Экспрессия молекулы гистосовместимости I и II классов. Все нейтрофилы и моноциты экспрессировали молекулы I класса гистосовместимости. При этом интенсивность экспрессии HLA-ABC нейтрофилами не менялась достоверно при стимуляции клеток микробными стимулами ($N = 2,90$, $p = 0,715$), а таковая моноцитами – усиливалась при воздействии ЛПС и лактобактерий ($p < 0,03$).

Нейтрофилы не экспрессировали молекулу HLA-DR, а экспрессия ее CD14⁺ моноцитами составляла > 98%. Интенсивность экспрессии HLA-DR моноцитами под влиянием микроор-

Таблица 1. Экспрессия CD284 нейтрофилами и моноцитами

Исследуемые препараты	Экспрессия CD284, %		Интенсивность экспрессии CD282, усл. ед.
	Нейтрофилы	Моноциты	Моноциты
DPBS	8,2(7,6–9,6)	8,0(6,5–8,7)	22,6(20,5–25,2)
ЛПС	14,0(12,2–16,6)	17,1(15,6–18,9)	33,8(32,5–34,5)
<i>L. acidophilus</i>	15,9(14,3–17,5)	20,0(18,6–20,5)	29,0(27,7–30,1)
<i>E. coli</i>	14,9(14,2–16,1)	24,1(22,3–25,6)	27,6(24,5–30,2)
Клеточные стенки лактобактерий	16,4(14,1–18,1)	24,3(21,2–25,9)	27,4(25,6–30,3)
Бактериальные «тени» <i>E. coli</i>	16,1(14,3–17,6)	20,6(17,6–23,2)	35,1(32,3–37,5)

Таблица 2. Интенсивность экспрессии CD11b моноцитами и нейтрофилами

Исследуемые препараты	Интенсивность экспрессии CD11b, усл. Ед.	
	Нейтрофилы	Моноциты
DPBS	37,1(30,2–42,5)	42,3 (30,1–49,5)
ЛПС	415,6(380,3–490,6)	397,9(310,0–469,9)
<i>L. acidophilus</i>	211,1 (180,5–255,6)	159,2(100,4–202,3)
<i>E. coli</i>	734,8 (650,5–810,4)	438,6(355,7–490,0)
Клеточные стенки лактобактерий	581,4(500,6–711,6)	301,0 (240,1–355,6)
Бактериальные «тени» <i>E. coli</i>	475,5 (400,0–545,8)	307,5(274–366,8)

Таблица 3. Экспрессия CD62L нейтрофилами и моноцитами

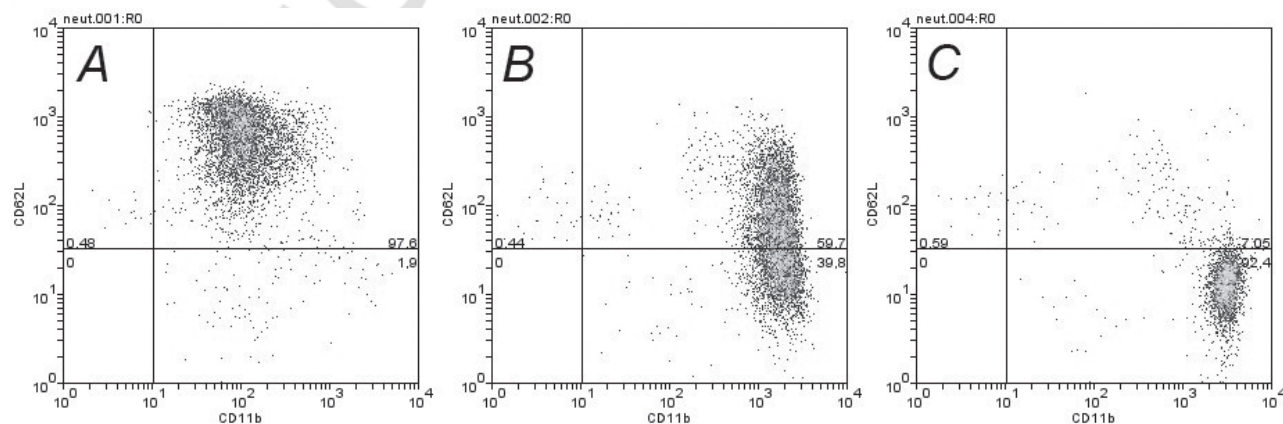
Исследуемые препараты	Экспрессия CD62L	
	Число CD62L ⁺ клеток, %	Интенсивность экспрессии, усл. ед.
Нейтрофилы		
DPBS	97,3(96,1–99,9)	190,3(185,1–210,6)
ЛПС	75,3(68,1–85,9)	33,0(28,0–37,4)
<i>L. acidophilus</i>	90,9(81,4–95,9)	129,2(100,5–165,4)
<i>E. coli</i>	10,2(8,1–15,6)%	16,1(12,4–20,5)
Клеточные стенки лактобактерий	52,1(43,1–60,7)	21,3(17,9–30,5)
Бактериальные «тени» <i>E. coli</i>	56,3(47,5–62,2)	23,1(17,3–26,6)
Моноциты		
DPBS	94,0(90,1–98,9)	279,3(230,2–310,4)
ЛПС	46,6(35,9–52,1)	43,0(28,1–55,6)
<i>L. acidophilus</i>	89,5(75,4–95,1)	182,8(157,1–200,1)
<i>E. coli</i>	34,1(29,0–41,2)	27,8(21,9–35,8)
Клеточные стенки лактобактерий	74,2(68,9–80,4)	103,7(90,0–118,3)
Бактериальные «тени» <i>E. coli</i>	36,7(30,0–47,6)	73,1(67,5–88,7)

ганизмов и их компонентов значительно возросла: ОК – 257,1 (239,3–270,9) усл. ед., ПК – 570,6 (558,0–593,0) усл. ед., компоненты бактерий – от 526,9 усл. ед. до 605,6 усл. ед. (медианные значения).

Экспрессия молекул CD35, CD62L и CD64 под влиянием инактивированных вирусов. С целью выявления потенциального активирующего влияния вирусов на клетки иммунной системы, исследована экспрессия молекул CD35, CD62L и CD64 нейтрофилами и моноцитами после инкубации с инактивированным вирусом гриппа (рисунок 4). Установлено, что инактивированный вирус гриппа достоверно снижал интенсивность экспрессии CD62L нейтрофилами ($p = 0,022$). Помимо того выявлена тен-

денция к увеличению экспрессии CD35 нейтрофилами ($p = 0,051$) под действием вируса. Статистически достоверных изменений других показателей не выявлено, что позволяет сделать вывод о слабом активирующем влиянии вирусов на нейтрофилы и моноциты, а следовательно, на пригодность данных показателей для дифференциальной диагностики этиологии инфекций.

Тест активации моноцитов и нейтрофилов. Проведен сравнительный анализ результатов исследования. Для исследованных молекул рассчитаны индексы активации клеток, которые представляют собой: 1) отношение процента позитивных по маркеру клеток в стимулированных образцах к проценту клеток в ОК, либо

Рис. 3. Экспрессия молекул CD62L и CD11b нейтрофилами под влиянием А – ОК, В – ЛПС, С – *E. coli*

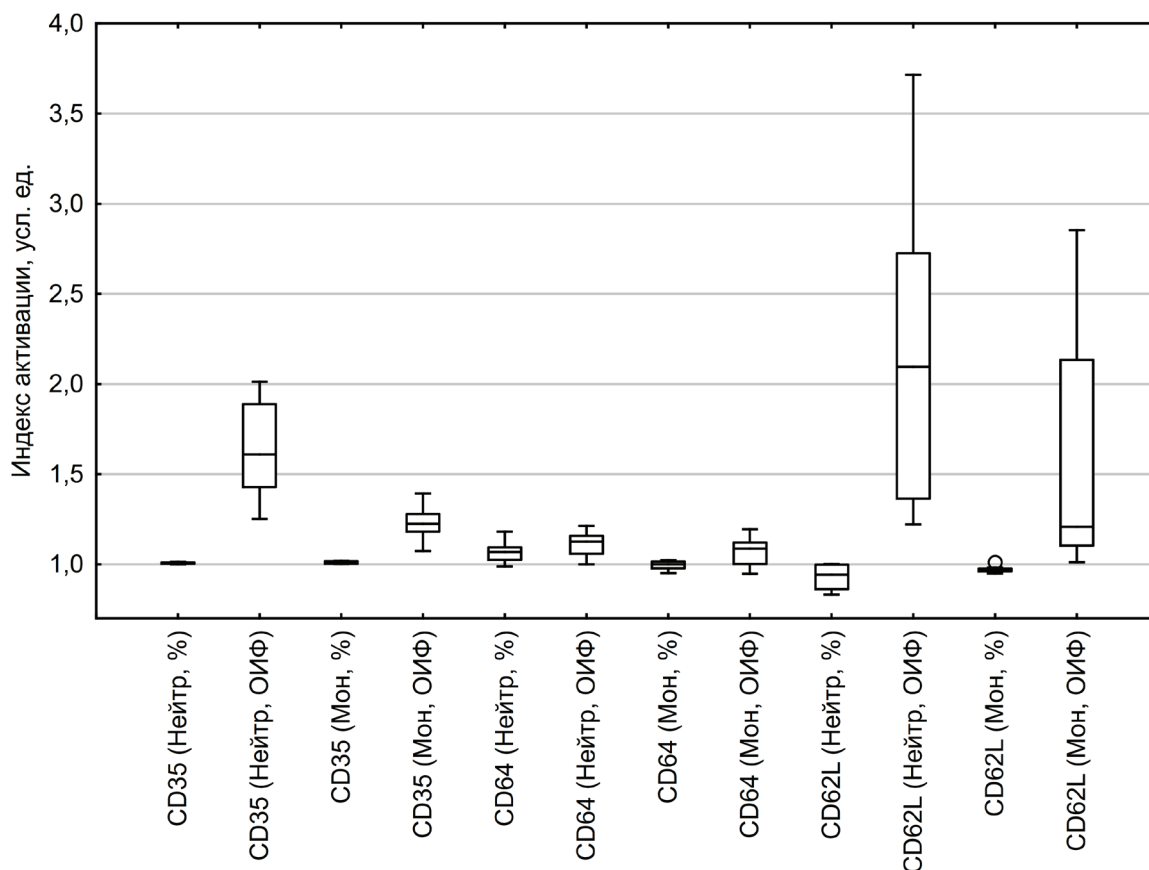


Рис. 4. Индексы активации под влиянием инактивированного вируса гриппа

2) отношение интенсивности экспрессии маркера стимулированными клетками к интенсивности экспрессии маркера клетками в ОК (рисунок 5). С учетом того, что процент и интенсивность экспрессии CD62L снижались в процессе активации ($IA < 1,0$), для приведения всех показателей к единой форме, выполнен пересчет по формуле: $1 / IA$.

Таким образом, установлено, что исследованные микроорганизмы и их компоненты даже в минимальной концентрации оказывали выраженное влияние на экспрессию паттерн-ассоциированных и схожих по функции рецепторов на поверхности нейтрофилов и моноцитов периферической крови, что служит обоснованием их использования в разработке метода дифференциальной диагностики острых инфекций. К молекулам, экспрессия которых нейтрофилами и моноцитами существенно усиливалась в процессе активации относятся CD11b, CD32, CD35, CD64 и CD88. В то же время, экспрессия молекул CD282, CD284 и HLA-DR значимо увеличивалась только моноцитами крови.

Экспрессия молекулы CD62L нейтрофилами и моноцитами уменьшалась в процессе активации; выявлена обратная корреляционная связь между экспрессией молекулы CD11b и CD62L нейтрофилами и моноцитами.

Несмотря на то, что изменение экспрессии исследованных нами молекул в процессе активации, в целом, описано в научной литературе, отсутствуют или недостаточны данные о степени изменения экспрессии молекул при оценке методом проточной цитометрии, что особенно важно для практической реализации предлагаемого метода дифференциальной диагностики.

Следует также отметить, что проведенные *in vitro* эксперименты являлись, фактически, безальтернативными для достижения цели исследования, поскольку моделирование бактериальных и вирусных инфекций на лабораторных животных для последующей оценки экспрессии маркеров активации невозможно. Это связано с существенными межвидовыми различиями в спектрах маркеров активации на поверхности

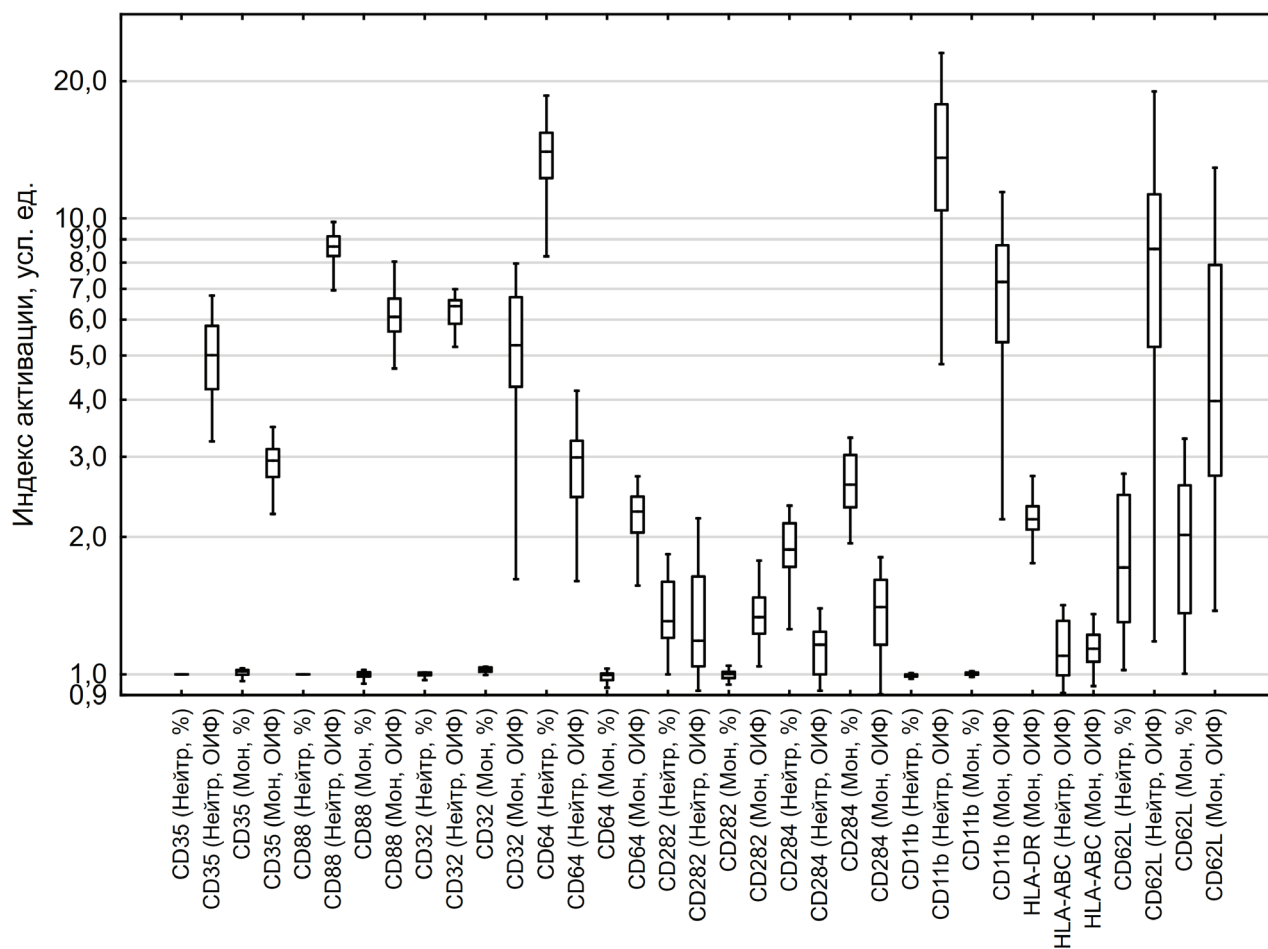


Рис. 5. Индексы активации под влиянием бактерий

клеток иммунной системы, что приводит к невозможности экстраполяции результатов.

С учетом полученных результатов были выбраны маркеры, определение которых будет проводиться в дальнейшем на клинических образцах (кровь пациентов с острыми нейроинфекциями и ОКИ).

Литература

1. Антонова, С. С., Ботвиньева В. В., Ситников И. Г. Дифференциальная диагностика бактериального и вирусного лимфаденита у детей // Вопросы современной педиатрии. – 2008. – Т. 7, № 3. – С. 76–78.
2. Кудин, А. П., Явгель А. В., Астапов А. А. Клинико-лабораторные особенности бактериальных менингитов у детей первых 3-х месяцев жизни // Медицинская панорама. – 2007. – № 9.
3. Старовойтова, Е. В. Сравнительная характеристика уровня лейкоцитоза, С-реактивного белка, прокальцитонина при дифференциальной диагностике острых тонзиллитов у детей / Е. В. Старовойтова [и др.] // Педиатрическая фармакология. – 2007. – Т.4, № 3. – Р. 45–49.
4. Титов, Л. П. Взаимодействие бифидобактерий и их компонентов с полинуклеарными и мононуклеарными клетками крови человека / Л. П. Титов, А. Е. Гончаров, А. С. Мурашко, Н. А. Головнева, Э. И. Коломиец // Весці НАН Беларусі. Сер. мед. навук. – 2013. – № 2. – С. 10–18.
5. Genser, B. A guide to modern statistical analysis of immunological data [Electronic resource] / B. Genser [et al.] // BMC Immunol. – 2007. – Vol. 8, N 27. – Mode of access : <http://www.biomedcentral.com/1471-2172/8/27>. – Date of access : 19.06.2016.
6. Krishnaswamy, J. K., Chu, T., Eisenbarth, S. C. Beyond pattern recognition: NOD-like receptors in dendritic cells / J. K. Krishnaswamy, T. Chu, S. C. Eisenbarth // Trends in Immunology. – 2013. – Vol. 4, N 5. – P. 224–233.
7. Messer, J. The cellular autophagy/apoptosis checkpoint during inflammation / J. Messer // Cell. Mol. Life Sci. – 2017. – Vol. 74, N. 7. – P. 1281–1296.
8. Monie, T. NLR activation takes a direct route / T. Monie // Trends. Biochem. Sci. – 2013. – Vol. 38, N. 3. – P. 131–139.
9. Shapiro, S. Expression of matrix metalloproteinases, sICAM-1 and IL-8 in CSF from children with meningitis / S. Shapiro [et al.] // J. Neurol. Sci. – 2003. – Vol. 206. – P. 43–48.

Поступила 06.03.2017 г.