

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

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

**СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ  
ИНФЕКЦИОННОЙ ПАТОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА**

**Сборник научных трудов**

**выпуск 8**

Минск

2015

**КОЛЛЕКЦИЯ КУЛЬТУР КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ  
РНПЦ ЭПИДЕМИОЛОГИИ И МИКРОБИОЛОГИИ: НЫНЕШНЕЕ СОСТОЯНИЕ  
И ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ**

*Корень С.В., Кабанова Ю.А., Антонец Н.Г., Дуж Е.В.,  
Гончаров А.Е., Шиманович В.П., Горбунов В.А.*

*Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии»,  
Минск, Республика Беларусь*

**Реферат.** Представлена информация о коллекции культур клеток, созданной в РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, принципах ее организации, исследованиях, методах контроля качества, перспективах развития

**Ключевые слова:** перевиваемые линии клеток, криоконсервация, видоспецифичность, кариотип.

**Введение.** Культуры клеток используются в различных областях биологии и медицины для диагностики вирусных инфекций, изучения процессов клеточного деления, дифференцировки и регуляции экспрессии генов, для выявления молекулярных механизмов канцерогенеза и наследственных заболеваний человека, а также для создания диагностических препаратов и вакцин и др.

Для получения культур клеток, изучения их морфофункциональных свойств, накопления биомассы и хранения, а также для обеспечения клеточным материалом учреждений здравоохранения, научных лабораторий и других учреждений создаются Национальные коллекции клеточных культур. Наиболее крупными мировыми коллекциями являются: ATCC — Американская коллекция типовых культур (American Type Culture Collection) и ECACC — Европейская коллекция клеточных культур (European Collection of Cell Cultures). Существуют такие коллекции во многих странах Европы (Германия, Великобритания, Россия и др.) и Азии (Япония, Китай).

Как правило, Национальные коллекции получают целевое государственное финансирование или финансовую поддержку от крупных биотехнологических и фармацевтических компаний, использующих клеточные культуры для производства биологически активных соединений.

Неотъемлемой частью коллекции является криобанк эталонных культур клеток человека и животных. Депонированные в криобанк культуры должны быть паспортизованы, охарактеризованы кариологически, по культурально-морфологическим свойствам, отсутствию контаминации бактериями, дрожжеподобными грибами, микоплазмами, вирусами, чувствительности к вирусам, по продукции гормонов, ферментов и др. [1–4].

В государственном учреждении «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии» (РНПЦ эпидемиологии и микробиологии) при лаборатории иммунологии и клеточной биотехнологии создана «Коллекция перевиваемых клеток человека и животных для диагностики инфекционных заболеваний». Коллекция создана в соответствии с приказом РНПЦ эпидемиологии и микробиологии от 22.04.2015 № 26 «О создании коллекции культур клеток человека и животных». В данный момент коллекция насчитывает 55 линий клеток человека и животных (таблица 1).

Таблица 1. — Перечень линий клеток, входящих в «Коллекцию перевиваемых клеток человека и животных» при РНПЦ эпидемиологии и микробиологии

№	Наименование	Происхождение
1	46-47	Африканская зеленая мартышка, почка
2	A-172	Человек, глиобластома
3	BGM	Африканская зеленая мартышка, почка
4	C6	Крыса, глиома
5	C8166	Человек, Т-лимфобластный лейкоз
6	CaCo-2	Человек, аденокарцинома ободочной кишки
7	CCRF-SB	Человек, острый лимфобластный лейкоз (В-клетки)
8	CEM.NKR	Человек, Т-лимфобластный лейкоз
9	CEM-SS	Человек, Т-лимфобластный лейкоз
10	Daudi	Человек, лимфома Беркитта
11	EL-4	Мышь, лимфома, индуцированная диметилбензантраценом
12	FL	Человек, амнион
13	FRhK-4	Макака-резус, почка
14	HaCaT	Человек, иммортализованные кератиноциты
15	HEK-293	Человек, почка эмбриона
16	Hela M	Человек, эпителиоподобная карцинома шейки матки
17	HEP-2	Человек, эпидермоидная карцинома гортани
18	HL-60	Человек, промиелоцитарный лейкоз

Окончание таблицы 1

№	Наименование	Происхождение
19	HuTu 80	Человек, аденокарцинома двенадцатиперстной кишки
20	IM-9	Человек, миелома
21	IMR-32	Человек, нейробластома
22	Jurkat	Человек, Т-лимфобластный лейкоз
23	Jurkat-tat	Человек, Т-лимфобластный лейкоз
24	KG-1	Человек, острый миелоидный лейкоз
25	L929	Мышь, эмбрион
26	L1210	Мышь, асцитная жидкость (лимфобластный лейкоз)
27	Ma-104	Макака-резус, почка эмбриона
28	McCoy B	Мышь, клетки синовиальной жидкости
29	MDCK	Собака, почка
30	MDCK (NBL)	Собака, почка
31	Molt-3	Человек, Т-лимфобластный лейкоз
32	Molt-4	Человек, Т-лимфобластный лейкоз
33	Molt-4 Клон 8	Человек, Т-лимфобластный лейкоз
34	MT-2	Человек, Т-лимфобластный лейкоз
35	MT-4	Человек, Т-лимфобластный лейкоз
36	NFS-60	Мышь, миелоидный лейкоз
37	OKP-GS	Человек, карцинома почки
38	P388D1	Мышь DBA/2, лимфоидная неоплазма
39	P3X63Ag8.653	Мышь BALB/c, миелома, клон линии P3X63Ag8
40	PA-1	Человек, тератокарцинома яичника
41	Raji	Человек, лимфома Беркитта
42	RD	Человек, эмбриональная рабдомиосаркома
43	RPMI-1788	Человек, лейкоциты периферической крови здорового донора
44	T24	Человек, карцинома мочевого пузыря
45	U-2 OS	Человек, остеосаркома
46	U-251	Человек, глиома
47	U-937	Человек, гистиоцитарная лимфома
48	Vero	Африканская зеленая мартышка, почка
49	Vero (V)	Африканская зеленая мартышка, почка, сублиния Vero
50	ZR-75-1	Человек, рак молочной железы
51	СПЭВ	Свинья, почка эмбриона
52	CV-1	Африканская зеленая мартышка, почка
53	HCT-116	Человек, карцинома толстой кишки
54	THP-1	Человек, острый моноцитарный лейкоз
55	MDBK (NBL-1)	Бык домашний, почка

Коллекция постоянно пополняется за счет новых поступлений. Так, с мая 2013 г. по июнь 2015 г. коллекция пополнилась 34 культурами клеток. Расширение коллекции определяется запросами фундаментальных исследований и практическими задачами здравоохранения. В коллекцию входят культуры клеток человека (перевиваемые, диплоидные, монослойные и суспензионные лимфобластоидные) и многих видов животных (обезьян, крысы, мыши, собаки, домашней свиньи, домашнего быка). Данные культуры клеток используются в вирусологии для диагностики вирусных инфек-

ций, в иммунологии, биотехнологии, иммунофармакологии, а также для фундаментальных и прикладных научных исследований в медицине и биологии.

Разработаны технологии формирования и поддержания эталонного коллекционного фонда путем исследования культур клеток человека и животных после их восстановления из условий глубокого замораживания по основным оценочным критериям их качества: жизнеспособности, пролиферативной активности и наличию контаминации микроорганизмами. Осуществляется разработка оптимальных методов хранения, стандартизации клеточных линий, включая определение их биологических свойств. Разработаны режимы криогенизации применительно к конкретным культурам. Особое внимание уделяется стабильности культурально-морфологических, кариологических и других свойств культур клеток, в частности чувствительности к вирусам и бактериям. У большинства культур охарактеризован иммунофенотип и экспрессия ряда транскрипционных факторов.

**Контроль жизнеспособности.** После размораживания культур может наблюдаться снижение жизнеспособности клеток или их полная гибель. Причиной могут служить один или несколько факторов, а именно: изначальное состояние клеток перед заморозкой, состав среды для криоконсервирования, условия замораживания, температурные условия хранения и др. Жизнеспособность клеток после разморозки, как правило, оценивают рутинной окраской витальным красителем (0,4%-м раствором трипанового синего), с использованием интеркалирующих красителей (пропидия иодид, 7-аминоактиномицин Д, То-Про и пр.) и последующим учетом на проточном цитометре, а также по способности к формированию монослоя при пересевах. В дальнейшем при культивировании жизнеспособность подтверждается на основании высокой пролиферативной активности клеток (пролиферативную активность выражают индексом пролиферации — отношением количества выросших клеток к посеянным) в субпассажах, их способности к формированию монослоя в характерные сроки и наличия исходных морфологических данных, соответствующих их исконным первоначальным характеристикам.

Оценку апоптоза клеток осуществляют по связыванию аннексина V, конъюгированного с флуоресцеинизотиоцианатом.

Все депонированные в криобанк линии клеток во время культивирования имели типичную морфологию, не проявляли признаков цитодеструкции, индекс пролиферации увеличивался в пассажах, что говорит об адаптации культур после хранения в жидком азоте и оптимальных культуральных условиях.

**Контроль контаминации.** Для исключения присутствия в культурах бактерий и дрожжеподобных грибов используют рутинные бактериологические методы, применяя следующие питательные среды: тиогликолевая среда, питательный бульон и питательный агар с 5%-й глюкозой, среда Сабуро твердая. Данный показатель постоянно контролируется и производится выбраковка культур не соответствующих данному оценочному критерию.

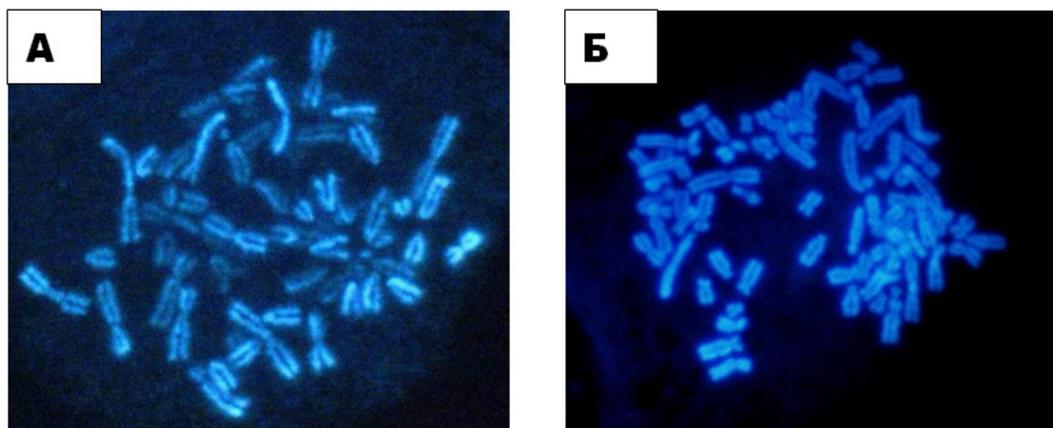
В рамках выполнения научных программ многие линии клеток были проверены на присутствие наиболее скрытого контаминанта клеточных культур — микоплазмы, которая в конечном счете приводит к гибели культуры при ее субпассировании и служит потенциальным источником артефактов в вирусологических, цитологических и биохимических исследованиях. Микоплазменная инфекция поражает как первичные (около 4%), так и перевиваемые (до 57-92%) культуры клеток. Зачастую при контаминации микоплазмами не выявляются видимые морфологические изменения, но происходит замедление роста клеток и ухудшение их адгезивной способности. При остром течении микоплазменной инфекции происходит резкое закисление среды, раннее отторжение от стекла с образованием дефектов монослоя уже на 3–4-е сут роста. Также наблюдается изменение морфологии клеток: зернистость цитоплазмы, кареорексис и пикноз ядер [5].

Одним из эффективных методов обнаружения микоплазм является экспресс-диагностика с применением красителя Hoechst 33342. В окрашенных препаратах при просмотре в люминесцентном микроскопе при наличии микоплазм над цитоплазмой и в межклеточных пространствах видны яркие точкоподобные образования, иногда в виде скоплений или нитевидных структур. При использовании данного метода не выявлено присутствия микоплазм в исследуемых культурах.

**Кариологический контроль.** Анализ хромосомного набора клеток позволяет контролировать природу культивируемых клеток, что делает возможным обнаружение взаимной контаминации различных линий клеток. При длительном культивировании в условиях *in vitro* клетки могут изме-

нять свой хромосомный набор, могут возникнуть различные хромосомные нарушения, что также необходимо контролировать. Для анализа присутствующих в клетках хромосом (кариотипирование) в культуры добавляют колхицин, чтобы блокировать делящиеся клетки в стадии метафазы. В метафазных клетках достаточно легко выявить общую массу хромосом, но трудно различить индивидуальные хромосомы. Для лучшего расхождения хромосом клетки выдерживают в гипотоническом растворе, затем клетки снимают и фиксируют.

В результате исследований проанализированы кариотипы ряда клеток. Для каждой культуры анализировали не менее 30 метафаз. В результате исследований был подтвержден кариотип, присутствующий каждой культуре клеток, не выявлено каких-либо хромосомных нарушений (рисунок 1).



Люминесцентная микроскопия, ув. 1000×

**Рисунок 1. — Метафазные пластинки культур клеток McCoy B (A) и MA-104 (B)**

**Контроль иммунофенотипа.** Для повышения эффективности иммунотерапии или научных исследований иногда необходимо применять определенные типы клеток, характеризующиеся высокой экспрессией определенных поверхностных и внутриклеточных маркеров. Поэтому контроль иммунофенотипа методом проточной цитофлуориметрии имеет большое значение для субклассифицирования типов клеток. В рамках исследований по тестированию лекарственных средств подгруппы иммуностимуляторов дана характеристика Т-клеточных (C8166, CEM-SS, CEM.NKR, Molt-3, Molt-4, Molt-4 клон 8, Jurkat, Jurkat-tat, MT-2 и MT-4) и В-клеточных культур (IM-9, Daudi и CCRF-SB) по экспрессии поверхностных маркеров, транскрипционных факторов, регуляторных белков и провоспалительных цитокинов. Для оценки иммунофенотипа анализировали экспрессию ряда молекул, наиболее важных для определения стадий дифференцировки Т- и В-клеток и оценки функционального потенциала.

**Контроль видовой принадлежности и кросс-контаминации.** Одной из серьезнейших проблем, с которой сталкиваются исследователи, является кросс-контаминация и неправильная идентификация клеточных линий, дающие, как правило, ложные результаты исследования. Наиболее известным и эффективным методом периодического контроля клеточных линий на предмет соответствия исходной видовой принадлежности и возможной контаминации клетками другого вида является ПЦР. На ее основе разработан ряд маркеров, которые в полной степени могут охарактеризовать отдельно взятый вид и популяцию.

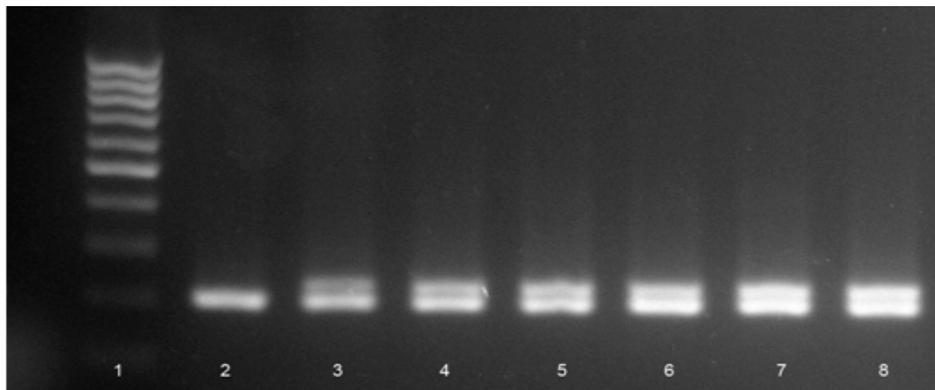
Нами оптимизированы условия постановки мультиплексной ПЦР для определения видовой принадлежности культур клеток и их межвидовой контаминации. Для разработки видоспецифичной ПЦР нами были выбраны участки гена *cytb* митохондриальной ДНК, кодирующие белки оксидазы цитохрома *b*, *D*-петлю и участок гена рибосомальной РНК 16S. Видовую принадлежность оценивали исходя из длин амплифицированных фрагментов ДНК после их визуализации в 2%-м агарозном геле.

На рисунке 2 показаны фрагменты, полученные при амплификации смесью видоспецифических праймеров ДНК, выделенных из 3 различных культур клеток: 2 — отрицательный контроль;

3–5 — ампликоны ДНК Hela-M (3), СПЭВ (4), MDCK (5); 6 — ДНК 3 культур, амплифицированная смесью видоспецифических праймеров к данным культурам

Для оценки чувствительности метода клетки Hela-M добавляли к клеткам MDCK в количестве 0; 1; 2; 5; 10; 25 и 50% соответственно.

На рисунке 2 показаны ампликоны длиной 196 п.о. (MDCK) и 228 п.о. (Hela-M).



1 — маркер 100 п.о.; 2 — 0%; 3 — 1%; 4 — 2%; 5 — 5%; 6 — 10%; 7 — 25%; 8 — 50%

**Рисунок 2. — Гель-электрофорез продуктов мультиплексной ПЦР, полученных при заражении культур клеток MDCK клетками Hela-M**

Показано, что для данных условий постановки полимеразной цепной реакции чувствительность составляла не менее  $1000 \pm 50$  кл/мл. При проведении реакции на определение межвидовой контаминации специфические фрагменты ДНК были детектированы во всех культурах, экспериментально контаминированных клетками Hela-M (1–50%).

**Криоконсервация.** Выживаемость клеток при криоконсервации зависит от их исходных физиологических свойств, состава консервирующей среды, а также режима замораживания. Поэтому для сохранения генофонда коллекционных клеточных линий были отработаны оптимальные условия их криоконсервации [6]. Для этого отбирают культуры в логарифмической фазе роста с сформированным монослоем с характерной для данных культур морфологией. Клетки снимают с флакона и переводят в суспензию общепринятым методом при помощи раствора трипсина-версена в соотношениях, указанных в паспортах. С целью сохранения наибольшей жизнеспособности клеток во время длительного хранения в жидком азоте в состав криосреды включают 8–10% высокоочищенного диметилсульфоксида (DMSO), необходимую для конкретной культуры клеток питательную среду, а также большое содержание сыворотки эмбрионов коров, которое составляло 30–70%.

Концентрацию клеток доводят до 3–5 млн/мл и разливают в специальные пробирки (виалы), предназначенные для хранения клеток в жидком азоте. Криоконсервацию клеток осуществляют с помощью программируемого замораживателя клеток Cryomed 7452 («Thermo Scientific», США), используя следующие временные и температурные режимы:

1.  $10^\circ/\text{мин}$  до  $+4^\circ\text{C}$ ;
2.  $1^\circ\text{C}/\text{мин}$  до  $-25^\circ\text{C}$ ,
3.  $12^\circ/\text{мин}$  до  $-90^\circ\text{C}$ .

Затем помещают пробирки в криохранилище с жидким азотом ( $-196^\circ\text{C}$ ).

После восстановления культур их ультраструктура отличается от культур, не подвергшихся замораживанию. Наблюдаются образование хлопьев хроматина на фоне просветленного матрикса ядра, расслоение ядерной мембраны, вакуолизация цитоплазмы, набухание рибосом, фрагментирование крист и др. Однако при пассировании эти явления исчезают и культуры 3–5 пассажей не отличимы от клеток исходной культуры. От пассажа к пассажи увеличивается и индекс пролиферации, пока не достигнет исходного уровня, характерного для данной культуры.

**Достижения и перспективы развития.** Информация о Коллекции включена в сводный каталог Российской коллекции клеточных культур (ФГБУН Институт цитологии РАН) и доступна по адресу: [http://www.cytspb.rssi.ru/rkkk/rkkk\\_ru.htm](http://www.cytspb.rssi.ru/rkkk/rkkk_ru.htm).

В настоящее время на 8 культур получены регистрационные удостоверения (таблица 2), в 2015 г. ожидается получение удостоверений еще на 5 культур клеток (Daudi, Jurkat-tat, MT-2, McCoy B, FRhK-4).

В лаборатории культуры клеток применяются как для научных исследований (в данный момент активно ведутся работы по применению лимфоидных и миелоидных линий клеток для тестирования лекарственных средств подгруппы иммуностимуляторов), так и для обеспечения учреждений здравоохранения и научных лабораторий клеточным материалом. Так, наиболее востребованными являются линии клеток: BGM, Fl, HeLa, Vero, СПЭВ, McCoy B.

В дальнейшем планируется расширение коллекции за счет новых поступлений клеток, регистрация востребованных культур, создание коллекции первичных культур и стволовых клеток, а также освоение, разработка, адаптация и внедрение новых методов контроля качества культур клеток.

Таблица 2. — Перечень культур клеток, имеющих регистрационное удостоверение

Наименование	Номер регистрационного удостоверения
Культура клеток почечной ткани обезьяны BGM	№ ИМ-7.97032
Культура клеток почки собаки перевиваемая MDCK	№ ИМ-7.94995/1407
Культура клеток амниона человека перевиваемая FL	№ИМ-7.94993/1407
Культура клеток легочной ткани кролика RL-33	№ИМ-7.101886
Культура клеток эпителиоидной карциномы шейки матки человека HeLa	№ИМ-7.101883
Культура клеток почечной ткани эмбриона свиньи СПЭВ	№ИИМ-7.101885
культура клеток почки эмбриона макаки-резуса MA-104	№ИИМ-7.101865
Культура клеток почки африканской зеленой маргаритки Vero E6	№ИИМ-7.101867

#### Литература

1. Применение культур клеток для вирусологических исследований / Р.Я. Подчерняева [и др.] // Клеточные культуры: информ. бюл. / Институт цитологии РАН. — СПб.: Изд-во Политехн. ун-та, 2014. — Вып. 30. — С. 56–71.

2. Interlab cell line collection: bioresource of established human and animal cell lines [Electronic resource] / V. Parodi [et al.] // Open J. Bioresour. — 2015. — Mode of access: <http://doi.org/10.5334/ojb.ah>. — Date of access: 19.06.2015.

3. Public biobanks: calculation and recovery of costs [Electronic resource] / B. Clement [et al.] // Sci. Transl. Med. — 2014. — Vol. 6. — P. 261fs45. — Mode of access: <http://stm.sciencemag.org/content/6/261/261fs45.full>. — Date of access: 19.06.2015.

4. Biomedical tissue culture / Eds.: L. Ceccherini-Nelli, B. Matteoli. — In Tech, 2012. — 248 p.

5. Young, L. Detection of Mycoplasma in cell cultures / L. Young // Nat. Prot. — 2010. — Vol. 5. — P. 929–934.

6. Cryobanking of viable biomaterials: implementation of new strategies for conservation purposes / D. Lermen [et al.] // Mol. Ecol. — 2009. — Vol. 18, № 6. — P. 1030–1033.

### COLLECTION OF HUMAN AND ANIMAL CELL LINES OF REPUBLICAN RESEARCH & PRACTICAL CENTER FOR EPIDEMIOLOGY & MICROBIOLOGY: CURRENT STATE AND PROSPECTS

*Koran S.V., Kabanova Y.A., Antonevich N.G., Duzh E.V., Hancharou A.Y., Shimanovich V.P., Harbunou V.A.  
State Institution "Republican Research & Practical Center for Epidemiology & Microbiology",  
Minsk, Republic of Belarus*

There is information concerning collection of cell cultures, organized in the RRPC for Epidemiology and Microbiology, the principles of its organization, conducted research, quality control methods, perspectives of development

**Keywords:** continuous cell lines, cryopreservation, species specificity, karyotype.

Поступила 16.09.2015

## ПРОФИЛЬ ЭКСПРЕССИИ ПОВЕРХНОСТНЫХ МАРКЕРОВ ЛИНИЯМИ КЛЕТОК МИЕЛОИДНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Дуж Е.В., Гончаров А.Е.

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии»,  
Минск, Республика Беларусь

**Реферат.** Проведен углубленный анализ экспрессии поверхностных маркеров клеточных линий миелоидного происхождения: HL-60 (человек, промиелоцитарный лейкоз), KG-1 (человек, острый миелоидный лейкоз), U-937 (человек, гистиоцитарная лимфома), ТНР-1 (человек, острый моноцитарный лейкоз). Для дальнейших экспериментов выбрана линия клеток ТНР-1, экспрессирующая наиболее полный набор молекул распознавания, адгезии и антигенпредставления.

**Ключевые слова:** иммуномодуляторы, миелоидные линии, перевиваемая культура клеток.

**Введение.** В настоящее время разработка и внедрение в производство лекарственных средств, обладающих иммуномодулирующим действием, осуществляется быстрыми темпами [1, 2]. Оценка биологической активности новых лекарственных средств с иммуномодулирующим действием является необходимой стадией их исследования на доклиническом этапе. Применение гемопоэтических перевиваемых клеточных линий человека является наиболее перспективным подходом для экспериментальных доклинических испытаний новых иммуномодуляторов [3]. Главное преимущество использования гемопоэтических линий заключается в высокой повторяемости и воспроизводимости результатов, возможности стандартизации и автоматизации условий проведения эксперимента [4].

Несмотря на то, что выбранные для исследования линии клеток хорошо известны, профиль экспрессии этими культурами ряда адгезивных, костимуляторных, коингибиторных молекул, рецепторов, опосредующих распознавание молекулярных структур, описан недостаточно.

**Цель** исследования — сравнительный анализ иммунофенотипа клеточных линий миелоидного происхождения HL-60, KG-1, ТНР-1 и U-937.

**Материалы и методы.** *Объекты исследований.* В качестве объектов *in vitro* исследований были использованы 4 перевиваемые клеточные линии миелоидного происхождения: HL-60 (человек, промиелоцитарный лейкоз), KG-1 (человек, острый миелоидный лейкоз), U-937 (человек, гистиоцитарная лимфома), ТНР-1 (человек, острый моноцитарный лейкоз). Все клеточные линии по характеру роста являются суспензионными культурами. Клетки растили на питательной среде RPMI-1640, содержащей 10–20%-ю эмбриональную сыворотку крупного рогатого скота (FCS), L-глутамин и пируват натрия в стерильных пластиковых вентилируемых флаконах в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при 37°C с содержанием 5%-го углекислого газа и относительной влажности 90%.

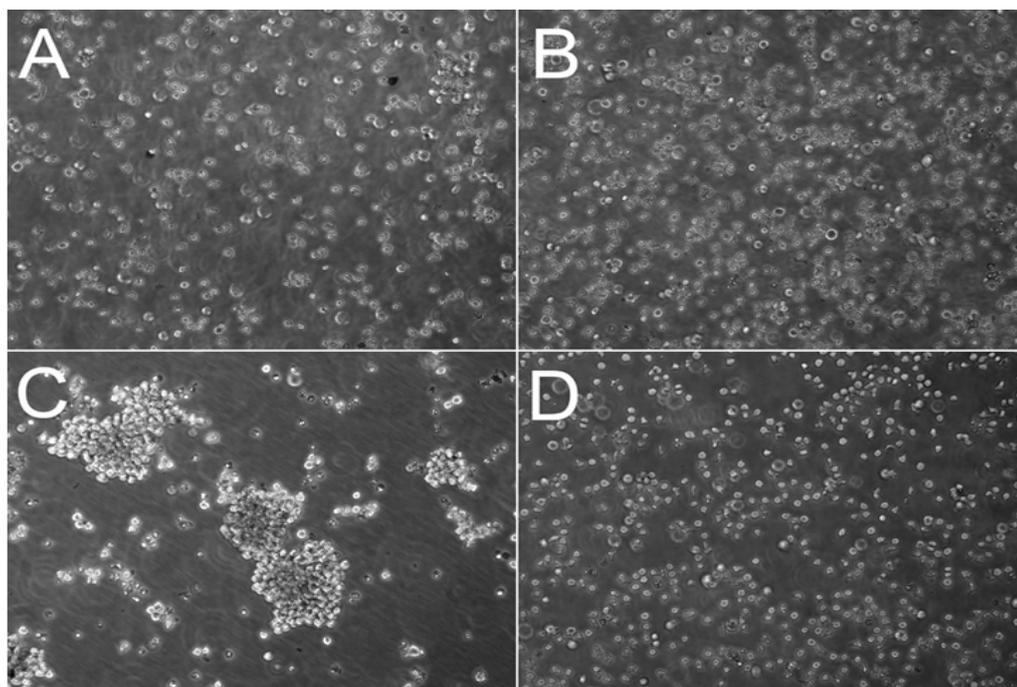
*Определение поверхностных молекул.* Иммунофенотип перевиваемых клеточных культур определяли методом проточной цитометрии. Для исследований были использованы моноклональные антитела к следующим антигенам человека: CD1a, CD1c, CD4, CD11b, CD11c, CD14, CD15, CD16, CD31, CD32, CD34, CD36, CD40, CD45, CD54, CD64, CD80, CD83, CD86, CD106, CD123, CD205, CD206, CD209, CD273, CD274, CD282, CD284, HLA-DR и HLA-ABC. Клетки инкубировали с моноклональными антителами 15 мин при +4°C в темноте. Несвязавшиеся антитела отмывали путем центрифугирования в фосфатном буферном растворе. После удаления супернатанта клетки ресуспендировали в 300 мкл фосфатного буферного раствора и анализировали на проточном цитометре.

*Статистическая обработка данных* выполнена с использованием непараметрических методов статистики (критерий Шапиро–Вилка, Манна–Уитни). В качестве критерия достоверности различий показателей принимали уровень значимости  $p < 0,05$ .

**Результаты и их обсуждение.** Микрофотографии исследованных линий клеток представлены на рисунке 1.

Все линии клеток имели типичную миелобластоидную или моноцитоподобную морфологию, из особенностей следует отметить склонность культуры клеток ТНР-1 к формированию микроколоний.

Был проведен сравнительный анализ антигенного профиля вышеуказанных линий клеток. Данные представлены в виде теплокарты с медианными значениями относительной интенсивности флуоресценции (рисунок 2).



A — HL-60; B — KG-1; C — THP-1; D — U937

Рисунок 1. — Микрофотографии линий клеток (×100)

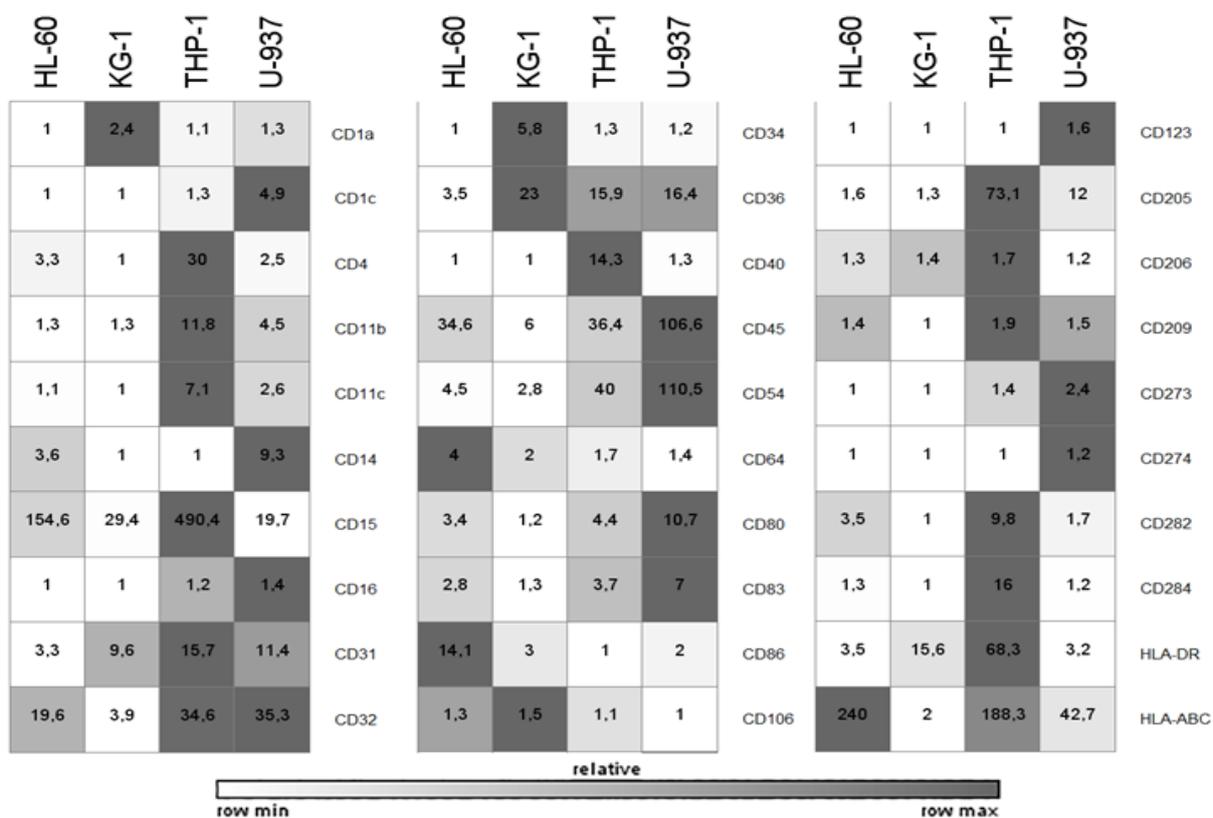


Рисунок 2. — Теплокарта, иллюстрирующая сравнительную экспрессию поверхностных антигенов линиями клеток

В процессе работы было установлено, что все исследуемые перевиваемые линии экспрессировали маркер гемопоэтических клеток — CD45. Линии клеток HL-60, ТНР-1 и U-937 экспрессировали молекулы HLA-ABC, что указывает на возможность иммунораспознавания и видовую специфичность. Экспрессия молекулы CD34, характеризующаяся как маркер стволовых клеток, в минимальном количестве присутствовала только на клеточной линии KG-1 (RFI = 5,8 усл. ед.), что может свидетельствовать о незрелости этой культуры. Экспрессия молекулы CD123 — рецептора к интерлейкину-3 — отсутствовала.

Принадлежность линий клеток к миелоидному росту была подтверждена высокой экспрессией мембранного маркера CD15.

*Паттерн-ассоциированные рецепторы и схожие по функции молекулы.* К паттерн-ассоциированным рецепторам относятся белки, присутствующие на поверхности лейкоцитов, способные узнавать молекулярные структуры (паттерны), специфичные для больших групп патогенов [5].

Установлено, что всем исследованным клеточным линиям, кроме KG-1, присуща в разной степени экспрессия мембранных белков, относящихся к толл-подобным рецепторам CD282 (TLR2) и CD284 (TLR4) [6, 7]. При этом наиболее высокая экспрессия молекул CD272 и CD247 выявлена на клетках линии ТНР-1.

Экспрессия молекулы CD14 — корецептора к липополисахариду (вместе с TLR-4) — присутствовала только на клетках линий HL-60 и U-937.

Также следует отметить, что исследуемые линии имеют разную интенсивность экспрессии CD205 (DEC-205) — молекулы, осуществляющей распознавание клеток в стадии апоптоза, — RFI от 1,6 до 73,2 усл. ед.

Лишь на линии клеток ТНР-1 наблюдалась минимальная экспрессия маркера CD206 (MMR) — рецептора лектинового типа, который распознает концевые остатки маннозы на поверхности микроорганизмов. Схожий паттерн экспрессии выявлен также в отношении молекулы CD209 (DC-SIGN).

По представленным данным фенотипически клетки отличаются между собой и экспрессией мембранного белка CD36, который относится к классу В скэвенджер-рецепторов и представленный в основном на макрофагах [8]. Так, наименее интенсивно эту молекулу экспрессировали клетки линии HL-60 (3,5(2,2-4,1) усл. ед.), а экспрессия CD36 не отличалась достоверно между линиями клеток ТНР-1, KG-1 и U-937.

*FC-рецепторы.* FC-рецепторы — белки, экспрессируемые преимущественно клетками миелоидного происхождения, которые распознают иммуноглобулины одного или нескольких изотипов [9].

Поверхностная молекула CD32 (FcγRII), которая присутствует на всех антигенпрезентирующих клетках, характеризовалась достаточно высокой экспрессией представленными линиями клеток.

В то же время молекула CD64 (FcγRI) — высокоаффинный рецептор для мономерного IgG — присутствовала в значимом количестве только на мембране клеток линии HL-60 ( $p < 0,01$ ), а низкоаффинный рецептор к IgG — CD16 (FcγRI) — не экспрессировался ни одной из исследованных линий клеток (RFI  $< 1,5$ ).

*Молекулы адгезии.* Молекулы адгезии представляют собой белки, связанные с поверхностной мембраной клетки, обеспечивающие взаимодействие клеток друг с другом [10].

Изученные нами линии характеризуются наличием адгезивных молекул CD11b, CD11c, CD54, характерных для всех лейкоцитов. В отличие от поверхностной молекулы CD106 (VCAM-1), которая экспрессируется на поверхности клеток в минимальных количествах, CD54 (ICAM-1) представлена в широком диапазоне (RFI от 2,8 до 110,5 усл. ед.). Наличие экспрессии CD11b (интегрин  $\alpha M$ ) и CD11c (интегрин  $\alpha X$ ) в миелоидных культурах наблюдалось только у ТНР-1 и U-937. Выявлена слабая экспрессия молекулы CD83 — одного из важных маркеров созревания дендритных клеток [11].

Экспрессия мембранного белка CD31 (PECAM-1) — молекулы клеточной адгезии — наблюдалась на всех клеточных линиях в различном диапазоне их значений с максимумом 15,7 (14,1–17,5) усл. ед. на линии клеток ТНР-1 ( $p < 0,01$ ).

*Молекулы, участвующие в антигенпредставлении.* По нашим данным, изучаемые клетки миелоидных линий очень слабо экспрессировали МНС-подобные молекулы, такие как CD1a (HTA1) и CD1c (BDCA-1), которые играют существенную роль в презентации липидных антигенов. Так, выявлена лишь слабая экспрессия молекулы CD1a на линии KG-1 (RFI = 2,4) и CD1c на U-937 (RFI = 4,9).

Все линии клеток на своей поверхности экспрессировали молекулы ГКС II класса при максимальной экспрессии (RFI = 68,3 (62,1–72,9) усл. ед.) на клеточной линии ТНР-1, что достоверно отличает эту линию клеток от других (HL-60 — 3,5 (3,1–3,9) усл. ед, KG-1 — 15,6 (14,8–16,1) усл. ед., U-937 — 3,2 (2,1–4,1) усл. ед,  $p < 0,001$ ).

*Костимуляторные и коингибиторные молекулы.* Костимуляторные молекулы входят в семейство В7, взаимодействие которых с молекулами CD28 и CD152 приводит к активации или торможению активности Т-хелперов [12]. Максимальная экспрессия молекулы CD80 установлена на клетках линии HL-60, а CD86 — клетками линии U-937.

В противоположность CD80 и CD86 молекулы CD273 (B7-DC) и CD274 (B7-H1), связываясь с PD-1, инициируют торможение функциональной активности клетки, в связи с чем получили название коингибиторные. Оценка иммунофенотипа исследуемых миелоидных культур показала практически полное отсутствие экспрессии коингибиторных молекул CD273 и CD274 на поверхностной мембране клеток.

Молекула CD40 (TNFRSF5) — рецептор CD154 — присутствовала исключительно на клетках линии ТНР-1 — 14,3 (12,7–15,1) усл. ед.

**Заключение.** Проведен сравнительный анализ иммунофенотипа 4 линий клеток, имеющих миелоидное происхождение, составлен профиль экспрессии поверхностных маркеров.

После исследований из всех миелоидных клеточных линий выбрана наиболее подходящая для изучения иммуномодулирующей активности лекарственных средств линия клеток — ТНР-1, экспрессирующая наиболее полный набор молекул распознавания, адгезии и антигенпредставления.

#### **Литература**

1. Лусс, Л.В. Место иммуномодуляторов в педиатрической практике / Л.В. Лусс // Педиатрия, приложение consilium medicum. — 2010. — № 3. — С. 72–76.
2. Synthetic and natural immunomodulators acting as interferon inducers / D. Silin [et al.] // Curr. Pharmaceut. Design. — 2009. — Vol. 15, № 3. — P. 1238–1247.
3. Руководство по проведению доклинических исследований / А.Н. Миронов [и др.]; под общ. ред. А.Н. Миронова. — М.: ГрифиК, 2012. — 944 с.
4. Marx, V. Models: stretching the skills of cell lines and mice / V. Marx // Nat. Meth. — 2014. — Vol. 11. — P. 617–620.
5. Taro, K. Review The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on toll-like receptors / K. Taro // Nat. Immunol. — 2010. — Vol. 11. — P. 373–384.
6. TLR2 may influence the behavior of the malignant clone in B-CLL / H. Antosz [et al.] // Blood Cells Molec. Dis. — 2012. — Vol. 49, № 1. — P. 32–40.
7. Literatures Introducing of toll-like receptor 4 (TLR4), lipopolysaccharide (LPS) / M. Hongbao [et al.] // Rep. Opin. — 2014. — Vol. 6, № 11. — P. 26–37.
8. CD36 ligands promote sterile inflammation through assembly of a Toll-like receptor 4 and 6 heterodimer / C. Stewart [et al.] // Nat. Immunol. — 2010. — Vol. 11, № 3. — P. 155–161.
9. Hogarth, P.M. Fc receptor-targeted therapies for the treatment of inflammation, cancer and beyond / P.M. Hogarth // Nat. Rev. Drug Discov. — 2012. — Vol. 11. — P. 311–331.
10. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part II. Modulation of pro-inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules / J. Calixto [et al.] // Planta Medica. — 2004. — Vol. 70, № 3. — P. 93–103.
11. Human dendritic cell line models for DC differentiation and clinical DC vaccination studies / J. Saskia [et al.] // J. Leukocyte Biol. — 2008. — Vol. 84, № 3. — P. 1364–1373.
12. The expression and function of costimulatory molecules B7H and B7-H1 on colonic epithelial cells / A. Nakazawa [et al.] // Gastroenterology. — 2004. — Vol. 126, № 5. — P. 1347–1357.

## **CELL SURFACE MARKER EXPRESSION PROFILE OF MYELOID CELL LINES**

*Duzh E.V., Hancharou A.Y.*

*State Institution "Republican Research & Practical Center for Epidemiology & Microbiology",  
Minsk, Republic of Belarus*

The myeloid lineage cell lines HL-60 (human, promyelocytic leukemia), KG-1 (human, acute myeloid leukemia), U-937 (human, histiocytic lymphoma), ТНР-1 (human, acute monocytic leukemia)

were subjected to comparative analysis of its phenotype profile. The results show that cell line THP-1 express the most comprehensive set of surface markers involved in molecular recognition, adhesion and antigen presentation. This line was selected for future studies.

**Keywords:** immunomodulators, myeloid line, continuous cell culture.

Поступила 22.09.2015

## **ЭКСПРЕССИЯ CCR5 И CXCR4 ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫМИ КЛЕТКАМИ ПРИ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ТРОПИЗМА ВИРУСА**

*Матиевская Н.В.<sup>1</sup>, Киреев Д.Е.<sup>2</sup>, Токунова И.О.<sup>1</sup>, Гончаров А.Е.<sup>3</sup>*

*<sup>1</sup>Учреждение образования «Гродненский государственный медицинский университет»,  
Гродно, Республика Беларусь;*

*<sup>2</sup>Федеральное бюджетное учреждение науки «Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора»,  
Москва, Российская Федерация;*

*<sup>3</sup>Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии»,  
Минск, Республика Беларусь*

**Реферат.** Установлено различие в экспрессии CCR5 и CXCR4 на разных стадиях ВИЧ-инфекции в зависимости от тропизма ВИЧ. У пациентов на стадии СПИД, инфицированных R5-тропным вариантом вируса, выявлено значимое снижение экспрессии CXCR4 на лимфоцитах крови и Т-хелперах, в то время как у пациентов, инфицированных не R5-тропным вариантом вируса, установлено снижение экспрессии CCR5 при сравнении с пациентами без СПИДа. Обнаруженные закономерности могут свидетельствовать о разных механизмах формирования иммуносупрессии в зависимости от характера тропизма вируса.

**Ключевые слова:** ВИЧ-инфекция, СПИД, тропизм, CCR5, CXCR4, иммунокомпетентные клетки.

**Введение.** Репликация ВИЧ в различных клетках человека инициируется связыванием поверхностных рецепторов вируса и клетки: gp120 и CD4+ соответственно. Далее происходят конформационные изменения в оболочке вируса, благодаря чему возникает возможность связывания региона V3 gp120 с одним из основных ко-рецепторов: CCR5 или CXCR4, что детерминировано после-

довательностью аминокислот в данном регионе. Тропизм ВИЧ определяется характером используемых вирусом ко-рецепторов. Выделяют CCR5/R5-тропные вирусы, CXCR4/X4-тропные и вирусы с двойным тропизмом, которые могут использовать оба ко-рецептора. С течением ВИЧ-инфекции у части пациентов происходит переключение тропизма ВИЧ и появление не R5-тропных вариантов вируса, которые используют либо оба ХР для входа в клетки человека (ВИЧ с двойным тропизмом), либо ко-рецептор CXCR4 (X4-тропные ВИЧ) [1, 2]. Принято считать, что переключение тропизма ВИЧ свидетельствует о прогрессировании заболевания, поскольку X4-тропный ВИЧ обладает более выраженной цитопатогенностью, способен индуцировать образование гигантских многоядерных клеток (синцития) в инфицированных клетках, в связи с чем он получил название синцитий индуцирующего (SI) ВИЧ. В то время как R5-тропный вирус называют не синцитий индуцирующий (NSI) [1, 3]. Вирулентные свойства R5 и X4 вирусов в условиях *in vivo*, главным образом, связаны с экспрессией ко-рецепторов на разных клетках хозяина. CXCR4 экспрессируются на CD4+ клетках, в т. ч. гемопоэтических клетках-предшественниках, клетках тимуса, naïve Т-лимфоцитах и моноцитах, в то время как CCR5 встречаются в основном на клетках памяти — Т-лимфоцитах и макрофагах. Таким образом, переключение тропизма и использование CXCR4 ко-рецепторов обеспечивает доступ вируса к пулу важных целевых клеток, участвующих в онтогенезе Т-лимфоцитов, что может привести к ускоренному снижению содержания CD4+ Т-клеток и прогрессированию заболевания [4, 5]. В связи с этим смена тропизма и появление CXCR4-тропного вируса имеет значение для прогнозирования и мониторинга заболевания, решения вопроса о присоединении антиретровирусной терапии, для оптимального использования антагонистов CCR5-рецепторов, применение которых эффективно только при условии наличия доминирующей популяции R5-тропного вируса в организме инфицированного пациента [6–8].

Установлено, что с прогрессированием ВИЧ-инфекции и формированием СПИДа имеет место противоположно направленная динамика экспрессии CCR5 и CXCR4 на лимфоцитах крови у ВИЧ-инфицированных пациентов: экспрессия CXCR4 снижается, в то время как экспрессия CCR5 увеличивалась, что связано с активацией иммунитета на стадии СПИД, с одной стороны, и гибели пула Т-лимфоцитов, конституционно экспрессирующих CXCR4 — с другой стороны [1, 4].

**Цель** исследования — выявление особенностей экспрессии CXCR4 и CCR5 на лимфоцитах крови и Т-хелперах у ВИЧ-инфицированных пациентов на разных стадиях ВИЧ-инфекции в зависимости от тропизма вируса.

**Материалы и методы.** Иммунологические исследования были выполнены у 29 ВИЧ-инфицированных пациентов (средний возраст составил  $33,5 \pm 7,2$  года; мужчин — 13; женщин — 16), которые не получали АРВТ. Клинические стадии ВИЧ (ВОЗ, 2012) были следующими: 1-я — 17 (58,6%); 2-я — 6 (20,7%); 3-я — 5 (17,2%); 4-я — 1 (3,5%). Среди пациентов 17 были инфицированы R5-тропным вариантом ВИЧ и 12 — не R5-тропным вариантом. Стадия СПИД диагностировалась при наличии у пациента 4-й клинической стадии ВИЧ-инфекции или содержания CD4+Т-лимфоцитов менее 200 кл/мкл. Определение тропизма ВИЧ проводилось путем секвенирования V3 петли гена gp120 с помощью набора реагентов «АмплиСенс HIV-Resist-Seq» производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии (РФ) согласно инструкции производителя. Показатель FPR был принят за 20%. Иммунофенотип клеток крови определяли на проточном цитофлюориметре «FACSCalibur» («BectonDickenson», США) с использованием программного обеспечения «CellQuest» 3.3 и «Weasel» версия 3.1 (WENI, Австралия). Для определения показателей иммунитета в работе использованы моноклональные антитела производства BectonDickinson (США) и ExBio (Чехия): CD3 (SK7), CD16 (B73.1), CD56 (NCAM 16.2), CD45 (2D1), CD19 (SJ25C1), CD4 (SK3), CD8 (SK1), CD184 (12G5), CD195 (2D7/CCR5).

Данные представлены в виде Me (min–max). Статистический анализ проводили с помощью пакета Statistica 10.

**Результаты и их обсуждение.** Распределение пациентов по стадиям ВИЧ-инфекции в группах исследования представлено в таблице 1.

Как видно из таблицы 1, в обеих группах были пациенты на стадии СПИД, что указывает на отсутствие переключения тропизма вируса с прогрессированием ВИЧ-инфекции у 17,6% пациентов 1-й группы. В то же время во 2-й группе у 66,7% ВИЧ-инфицированных пациентов отсутствовали клинико-лабораторные признаки СПИДа, несмотря на установленную инфекцию не R5-тропным вариантом вируса.

Таблица 1. — Распределение пациентов по стадиям ВИЧ-инфекции

Показатель	1-я группа, n = 17	2-я группа, n = 12	P*
СПИД	3 (17,6%)	4 (33,3%)	>0,05
Не СПИД	14 (82,4%)	8 (66,7%)	>0,05

Экспрессия хемокиновых рецепторов на лимфоцитах крови и Т-хелперах у пациентов изучаемых групп при разных стадиях ВИЧ-инфекции представлена в таблице 2.

Таблица 2. — Экспрессия хемокиновых рецепторов CCR5 и CXCR4 на клетках крови в зависимости от тропизма ВИЧ

Показатель	1-я группа, n = 17		p*	2-я группа, n = 12		p*
	Не СПИД, n=14	СПИД, n=3		Не СПИД, n=8	СПИД, n=4	
CXCR4, %	15,71 (5,0–35,6)	4,48 (2,1–14,3)	0,04	11,64 (0,0–28,4)	8,73 (6,0–33,0)	0,93
CXCR4, кл/мкл	293,60 (101,5–863,0)	53,92 (31,9–135,1)	0,01	206,89 (0,7–672,7)	68,20 (41,3–973,9)	0,40
CCR5, %	32,86(13,3–6,7)	42,58 (33,8–61,4)	0,2	34,52 (5,9–45,7)	36,60 (21,0–52,0)	0,50
CCR5, кл/мкл	664,26 (259,0–1555,7)	512,43 (505,2–579,5)	0,2	561,14 (132,7–33,1)	462,60 (110,2–1099,9)	0,87
CD4CXCR4, %	5,71 (1,5–13,7)	0,59 (0,07–8,3)	0,2	3,76 (0,0–14,1)	3,14 (0,8–17,3)	0,87
CD4CXCR4, кл/мкл	107,43 (30,7–331,7)	7,10 (1,1–78,4)	0,02	60,60 (0,0–166,3)	16,94 (10,6–510,0)	0,40
CD4CCR5, %	2,73 (0,8–4,0)	2,62 (0,7–3,3)	0,5	3,29 (0,6–7,2)	1,98 (0,6–4,2)	0,17
CD4CCR5, кл/мкл	54,84 (21,9–84,6)	31,36 (10,6–31,5)	0,06	61,90 (13,3–129,0)	20,81 (8,5–32,6)	<0,03

Примечание — \* — тест Манна–Уитни.

Как видно из таблицы 2, в обеих группах пациентов на стадии СПИД отмечена тенденция к снижению экспрессии XP CCR5 и CXCR4 на лимфоцитах крови и на Т-хелперах по сравнению с пациентами без СПИДа. Однако статистически достоверное снижение экспрессии CXCR4 на лимфоцитах крови и Т-хелперах при сравнении с пациентами без СПИДа установлено у пациентов, инфицированных R5-тропным вариантом ВИЧ. У пациентов, инфицированных не R5-тропным вариантом ВИЧ, при наличии СПИДа установлено значительное снижение экспрессии CCR5 на Т-хелперах. В то время как экспрессия CXCR4, который в данном случае является одним из основных ко-рецепторов ВИЧ, не различалась достоверно на разных стадиях ВИЧ-инфекции при инфекции не R5-тропным вирусом.

**Закключение.** Установлено различие в экспрессии CCR5 и CXCR4 при формировании СПИДа в зависимости от тропизма ВИЧ. У пациентов, инфицированных R5-тропным вариантом вируса, выявлено значимое снижение экспрессии CXCR4 на лимфоцитах крови и Т-хелперах, в то время как у пациентов, инфицированных не R5-тропным вариантом вируса, установлено снижение экспрессии CCR5 на Т-хелперах при сравнении с пациентами без СПИДа. Обнаруженные закономерности могут свидетельствовать о разных механизмах формирования иммуносупрессии в зависимости от характера тропизма вируса. Для выполнения окончательных выводов и расшифровки патогенетических механизмов формирования СПИДа при разном тропизме вируса требуются исследования в более обширных группах пациентов.

#### Литература

1. Матиевская, Н.В. Ко-инфекция ВИЧ/ВГС: этиология, эпидемиология, патогенез, клиника, диагностика, лечение / Н.В. Матиевская. — Гродно: ГрГМУ, 2013. — 352 с.
2. Mosier, D.E. How HIV changes its tropism: evolution and adaptation? / D.E. Mosier // Curr. Opin. HIV AIDS. — 2009. — Vol. 4, № 2. — P. 125–130.

3. Affinofile profiling: how efficiency of CD4/CCR5 usage impacts the biological and pathogenic phenotype of HIV / K. Chikere [et al.] // *Virology*. — 2013. — Vol. 435, № 1. — P. 81–91.
4. V3 loop sequence space analysis suggests different evolutionary patterns of CCR5- and CXCR4-tropic HIV / K. Bozek [et al.] // *PLoS One*. — 2009. — Vol. 4, № 10. — e7387.
5. Deep sequencing to infer HIV-1 co-receptor usage: application to three clinical trials of maraviroc in treatment-experienced patients / L.C. Swenson [et al.] // *J. Infect. Dis.* — 2011. — Vol. 203, № 2. — P. 237–245.
6. Fuse, S. Immune responses against persistent viral infections: possible avenues for immunotherapeutic interventions / S. Fuse, M.J. Molloy, E.J. Usherwood // *Crit. Rev. Immunol.* — 2008. — Vol. 28, № 2. — P. 159–183.
7. Matsiyenskaya, N. Activation of blood T-cells in HIV/HCV co-infected patient / N. Matsiyenskaya, V. Tsyrukunov // *Sanamed*. — 2013. — Vol. 8, № 1. — P. 11–18.
8. Activation and cell cycle antigens in CD4+ and CD8+ T cells correlate with plasma human immunodeficiency virus (HIV-1) RNA level in HIV-1 infection / J.M. Orendi [et al.] // *J. Infect. Dis.* — 1998. — Vol. 178, № 5. — P. 1279–1287.

## **CCR5 AND CXCR4 EXPRESSION BY IMMUNOCOMPETENT CELLS IN HIV-INFECTED PATIENTS DEPENDING ON VIRUS TROPISM**

*Matsiyenskaya N.V.<sup>1</sup>, Kireev D.E.<sup>2</sup>, Tokunova I.O.<sup>1</sup>, Hancharou A.Y.<sup>3</sup>*

<sup>1</sup>*Educational Establishment "Grodno State Medical University", Grodno, Republic of Belarus;*

<sup>2</sup>*Federal Budget Scientific Institution "Central Research Institute for Epidemiology", Moscow, Russian Federation;*

<sup>3</sup>*State Institution "Republican Research & Practical Center for Epidemiology & Microbiology",  
Minsk, Republic of Belarus*

Different pattern of CCR5 and CXCR4 expression on blood lymphocytes and T helpers in AIDS formation has been established depending on HIV tropism. In patients infected by R5 tropic viruses significant decreasing of CXCR4 on blood lymphocytes and T helpers were established. In the same time in patients infected by non R5 tropic viruses significant decreasing of CCR5 on T helpers were established. These data may reflect the different mechanism of immunosuppression formation depending on HIV tropism.

**Keywords:** HIV-infection, AIDS, tropism, CCR5, CXCR4, immunocompetent cells/

Поступила 23.09.2015

## ПРЕДИКТОРЫ ЗАТЯЖНОГО ТЕЧЕНИЯ ИНФЕКЦИОННОГО МОНОНУКЛЕОЗА

Гончаров А.Е.<sup>1</sup>, Давидович Г.М.<sup>2</sup>, Карпов И.А.<sup>2</sup>, Романова И.В.<sup>1</sup>, Гуцалюк И.Я.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии», Минск, Республика Беларусь;

<sup>2</sup>Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет», Минск, Республика Беларусь;

<sup>3</sup>Учреждение здравоохранения «Городская клиническая инфекционная больница», Минск, Республика Беларусь

**Реферат.** Несмотря на то, что изучение заболеваний человека, вызванных вирусом Эпштейна–Барр (ВЭБ), проводится многочисленными группами ученых в разных странах мира, до сих пор не были известны четкие критерии, которые позволили бы прогнозировать исход острой ВЭБ-инфекции. Нами выполнено иммунологическое и клинико-лабораторное обследование 33 взрослых пациентов с острой ВЭБ-инфекцией. У 12 пациентов установлено затяжное течение инфекционного мононуклеоза. Логистический регрессионный анализ показал, что предикторами затяжного течения инфекционного мононуклеоза являются: 1) содержание CD8<sup>+</sup> цитотоксических Т-лимфоцитов ниже  $1,9 \times 10^6/\text{мл}$  и/или 2) содержание CD39<sup>+</sup> Т-регуляторных клеток ниже  $0,008 \times 10^6/\text{мл}$  и/или 3) содержание CD28<sup>+</sup> Т-лимфоцитов ниже  $1,4 \times 10^6/\text{мл}$ . Установлена чувствительность и специфичность прогнозирования затяжного течения ИМ по вышеперечисленным показателям, а также определена точка диагностически значимого уровня для каждого из показателей.

**Ключевые слова:** инфекционный мононуклеоз, предикторы затяжного течения, Т-клетки, Т-регуляторные клетки.

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

ВЭБ способен вызывать значительные нарушения в иммунном статусе человека: изменение количества и свойств отдельных популяций лимфоцитов и гранулоцитов, нарушение функциональной активности моноцитов, дисбаланс продукции интерферонов и других цитокинов. В результате развивается вторичная иммунная недостаточность с выраженной депрессией клеточного иммунитета [1–3].

Несмотря на то, что изучение ВЭБ-ассоциированных заболеваний проводится многочисленными группами ученых в разных странах мира, до сих пор не известны четкие критерии, которые позволили бы прогнозировать исход острой ВЭБ-инфекции.

**Цель** исследования — выявление предикторов затяжного течения ИМ [1–4].

**Материалы и методы.** *Объекты исследований.* Объектами для *in vitro* исследований служили 62 образца периферической крови 31 пациента с ИМ (УЗ «Городская клиническая инфекционная больница» г. Минска). Пациентов обследовали дважды: на момент поступления в стационар (группа П1) и спустя 2–3 мес. после выписки (группа П2). Для получения контрольных значений ряда показателей использовали 22 образца крови доноров (группа сравнения, ГС), сопоставимых по возрасту и полу с пациентами. Медианный возраст пациентов составил 20,0 (19,0–25,0) лет, а здоровых добровольцев — 24 (26,0–28,0) года.

*Определение иммунофенотипа клеток крови.* Иммунофенотип лейкоцитов определяли методом проточной цитометрии с использованием 3–8 цветовых меток.

Учет проводили на проточных цитофлюориметрах «FACSCalibur» и «FACSCantoII». Данные анализировали при помощи программного обеспечения Weasel версии 3.0.2 и FACSDiva версии 7.

*Статистический анализ.* Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием программ Statistica 10, StatPlus 4.9 (AnalystSoft, Канада) и SPSS 22 (IBM, США). Значения показателей представлены в виде медианы с интерквартильным размахом в виде 25-й и 75-й перцентилей. Нормальность распределения величин оценивали с использованием W-критерия Шапиро–Вилка и критерия Колмогорова–Смирнова/Лиллиефорса. Учитывая отсутствие в большинстве исследованных выборок нормального распределения, для сравнения групп данных и изучения корреляционных взаимосвязей использовали непараметрические методы. Для поиска предикторов за-

тяжкого течения был применен логистический регрессионный анализ. Для всех изучаемых факторов вычисляли коэффициент логистической регрессии, стандартную ошибку коэффициента, отношение рисков (ОР), 95% доверительные интервалы (ДИ) и статистическую значимость (р). Для определения диагностической ценности показателей был использован метод ROC-анализа с расчетом площади под рабочей характеристической кривой (AUROC). В качестве критерия достоверности различий показателей принимали уровень значимости  $p < 0,05$ .

**Результаты и их обсуждение.** *Характеристика пациентов, страдающих инфекционным мононуклеозом.* Пациенты поступали в стационар с 4 по 26-й день болезни, медиана приходилась на 9-й день. Заболевание начиналось остро с появления фебрильной температуры у 27 пациентов, постепенное начало заболевания отмечено у 4 пациентов. Интоксикационный синдром присутствовал у всех пациентов и проявлялся умеренной слабостью, бледностью кожных покровов, головной болью и тошнотой. Лихорадка присутствовала у всех обследованных пациентов. У 5 пациентов на коже туловища или конечностей была выявлена пятнисто-папулезная сыпь. Все пациенты с экзантемой на амбулаторном этапе принимали антибиотики, преимущественно аугментин.

Аденопатия была выявлена в 96,8% случаев. В патологический процесс вовлекались преимущественно подчелюстные (74,2%) и шейные лимфоузлы (90,3%). Реже наблюдалось увеличение других групп лимфоузлов: подмышечных (35,5%), затылочных (22,6%), паховых (3,2%), углочелюстных (6,5%) и околоушных (3,2%). У пациентов чаще всего были увеличены 2 (51,5%) и 3 (32,3%) группы лимфоузлов, реже — 4, 5 групп лимфоузлов одновременно (по 3,2%). Увеличение одной группы лимфоузлов выявлено у 2 пациентов из 33. Болезненность лимфоузлов наблюдалась у 54,5% пациентов. У 6 пациентов (19,5%) заболевание протекало в желтушной форме. Заболевание имело среднетяжелое течение у всех обследованных.

У пациентов в периферической крови определяли относительное и абсолютное содержание субпопуляций лимфоцитов периферической крови методом проточной цитометрии: Т-клеток с разным типом Т-клеточного рецептора, Т-хелперов и Т-цитотоксических клеток, субпопуляций Т-клеток памяти, Т-регуляторных клеток, естественных киллерных клеток, В-лимфоцитов, а также пДК и CD1c<sup>+</sup>/CD141<sup>+</sup> субпопуляций мДК, CD14<sup>+</sup>/CD16<sup>+</sup> моноцитов крови, М-МЛСК и CD15<sup>+</sup>/CD33<sup>+</sup> Г-МЛСК. Исследовали цитокиновый статус — продукцию цитокинов ИНФ- $\gamma$  и ФНО- $\alpha$ , а также содержание Т-клеток, специфичных к ВЭБ.

При клиническом обследовании пациентов через 2–3 мес. после выписки из стационара установлено клиническое выздоровление у 22 пациентов (71%). У 12 пациентов имелись клинико-лабораторные признаки заболевания: увеличение лимфоузлов — 6 пациентов, гепатомегалия — 8 пациентов, спленомегалия — 3 пациента, фарингит, гипертрофия миндалин — 5 человек, наличие ДНК ВЭБ в плазме крови — 8 пациентов, увеличение числа CD3<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> клеток свыше 20% — 7 пациентов, наличие атипичных мононуклеаров — у 2 человек, усиление активности АЛТ более, чем в 2 раза — у 6 пациентов.

*Предикторы затяжного течения инфекционного мононуклеоза.* Для поиска предикторов затяжного течения был применен логистический регрессионный анализ. Для всех изучаемых факторов (клинико-лабораторные и иммунологические показатели) вычисляли коэффициент логистической регрессии, стандартную ошибку коэффициента, отношение рисков, 95% доверительные интервалы и статистическую значимость.

Анализ результатов исследования показал, что предикторами затяжного течения инфекционного мононуклеоза являются:

- 1) низкое абсолютное содержание CD8<sup>+</sup> цитотоксических Т-лимфоцитов;
- 2) низкое абсолютное содержание CD39<sup>+</sup> Т-регуляторных клеток;
- 3) низкое абсолютное содержание CD28<sup>+</sup> Т-лимфоцитов (таблица).

Полученные результаты указывают, что нормальное течение ИМ с значительной пролиферацией цитотоксических CD8<sup>+</sup> Т-клеток и в противовес повышенному содержанию CD39<sup>+</sup> Т-регуляторных клеток и CD28<sup>+</sup> Т-лимфоцитов в большинстве случаев заканчивается клиническим выздоровлением. В то же время наибольший риск затяжного течения ИМ наблюдается у пациентов, иммунная система которых изначально слабо реагировала на ВЭБ, т. е. фактически развивалась анергия.

Таблица — Результаты моновариантного логистического регрессионного анализа и ROC-анализа

Показатель	ОР	95% ДИ	p	Площадь под ROC-кривой	cut-offpoint	Чувствительность, %	Специфичность, %
CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> (абс. значения)	0,71	0,62–0,85	0,013	0,824±0,094	1,865	84,6	71,4
CD39 <sup>+</sup> Т-рег. клетки (абс. значения)	0,93	0,87–0,99	0,034	0,956±0,043	0,0082	92,3	85,7
CD28 <sup>+</sup> Т-клетки (абс. значения)	0,85	0,73–0,99	0,003	0,901±0,077	1,415	92,3	85,7

Уменьшение числа Т-регуляторных клеток, казалось бы, должно приводить к усилению противоинфекционного иммунитета. В то же время, как видно из представленных данных, невысокое содержание Т-регуляторных клеток не позволяет полноценно контролировать избыточную пролиферацию Т-цитотоксических лимфоцитов. Снижение содержания Т-клеток, экспрессирующих ко-стимуляторную молекулу CD28, также уменьшает резервы противоинфекционного иммунитета, что проявляется в неспособности иммунной системы противодействовать репликации вируса.

Следует также отметить, что в процессе анализа была также выявлена тенденция ( $p < 0,1$ ) в отношении содержания общей фракции CD4<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>CD25<sup>hi</sup> Т-регуляторных клеток, активированных CD3<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> Т-клеток, Т-клеток, экспрессирующих молекулу PD-1.

Методом ROC-анализа установлена чувствительность и специфичность выявления затяжного течения ИМ по вышеперечисленным показателям, а также определена точка диагностически значимого уровня (cut-offpoint) — величина, используемая для разделения ряда значений на две части (т. е. пациенты с риском затяжного течения и таковые без риска).

Графически результаты представлены на рисунке.

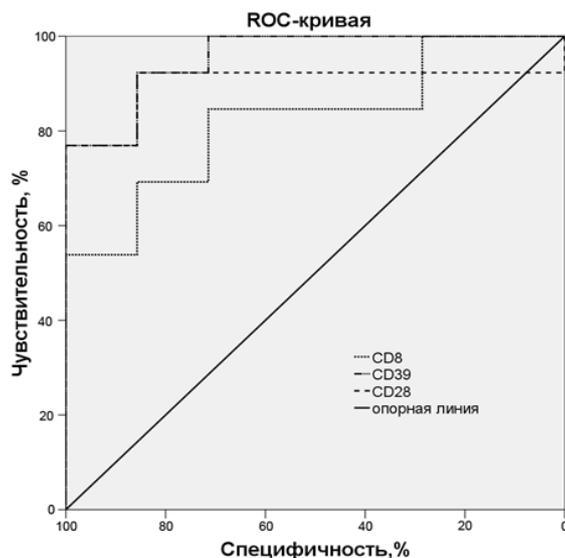


Рисунок — ROC-кривая вероятности развития затяжного течения ИМ в зависимости от содержания ряда субпопуляций Т-клеток в крови

Полученные результаты позволили подготовить проект инструкции по применению «Метод определения маркеров инфекционного мононуклеоза» (регистрационный № 061-0615, утверждена 04.09.2015). Инструкция предназначена для врачей-лаборантов и врачей-инфекционистов учреждений здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь пациентам, страдающим инфекционным мононуклеозом.

**Заключение.** Выполнено иммунологическое и клинико-лабораторное обследование 33 взрослых пациентов с острой ВЭБ-инфекцией (ИМ), которые лечились на базе УЗ «Городская клиническая инфекционная больница» г. Минска. У 12 пациентов установлено затяжное течение инфекционного

мононуклеоза. Логистический регрессионный анализ показал, что предикторами затяжного течения инфекционного мононуклеоза являются: 1) содержание CD8<sup>+</sup> цитотоксических Т-лимфоцитов ниже  $1,9 \times 10^6$ /мл и/или 2) содержание CD39<sup>+</sup> Т-регуляторных клеток ниже  $0,008 \times 10^6$ /мл и/или 3) содержание CD28<sup>+</sup> Т-лимфоцитов ниже  $1,4 \times 10^6$ /мл. Установлена чувствительность и специфичность выявления затяжного течения ИМ по вышеперечисленным показателям, а также определена точка диагностически значимого уровня для каждого из показателей

Таким образом, результаты исследования указывают возможность использования установленных предикторов затяжного течения ИМ в рутинной клинической практике.

#### Литература

1. 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.
2. Predictors of fatigue following the onset of infectious mononucleosis / B. Candy [et al.] // *Psychol. Med.* — 2003. — Vol. 33, № 5. — P. 847–855.
3. 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.
4. Chronic fatigue syndrome following infections in adolescents / B.Z. Katz [et al.] // *Curr. Opin. Pediatr.* — 2013. — Vol. 25, № 1. — P. 95–102.

### PREDICTORS OF PROLONGED ILLNESS IN PATIENTS WITH INFECTIOUS MONONUCLEOSIS

*Hancharou A.Y.<sup>1</sup>, Davidovich G.M.<sup>2</sup>, Karpov I.A.<sup>2</sup>, Ramanava I.U.<sup>1</sup>, Gutsaluk I.Y.<sup>3</sup>*

*<sup>1</sup>State Institution "Republican Research & Practical Center for Epidemiology & Microbiology",  
Minsk, Republic of Belarus;*

*<sup>2</sup>Educational Establishment "The Belarusian State Medical University", Minsk, Republic of Belarus;*

*<sup>3</sup>Healthcare Institution "Municipal Clinical Infectious Diseases Hospital", Minsk, Republic of Belarus*

The prolonged illness was diagnosed in 12 of 27 patients with infectious mononucleosis (IM). Logistic regression analysis revealed 3 statistically significant predictors of prolonged illness: CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-cell count lower 1.865 cells per ul ( $p = 0.0013$ ), CD39<sup>+</sup> T-regs count lower 8.2 cells per ul ( $p = 0.034$ ) and CD28<sup>+</sup> T-cell count lower 1.415 cells per ul ( $p = 0.003$ ). The results of our investigation demonstrate that the prolonged illness in the patients with IM is related to the decrease of both pro-inflammatory (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>) and anti-inflammatory (CD39<sup>+</sup> T-regs) subsets, while patients with robust increase of CD8<sup>+</sup> T-cells and T-regs in the onset of the disease tend to fast and complete recovery. The sensitivity and specificity of the predictors described in the prognosis of prolonged illness was calculated: CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> — 84.6 and 71.4%, CD39<sup>+</sup> T-regs and CD28<sup>+</sup> T-cells — 82.3 and 85.7% correspondingly.

**Keywords:** infectious mononucleosis, immune status, T-cells, T-regulatory cells, prolonged illness.

Поступила 16.09.2015