

**На правах рукописи**

**КРЕМЕР**

**Елена Эдуардовна**

**КЛЕТОЧНЫЕ МЕХАНИЗМЫ МОДИФИКАЦИИ ИММУННОГО  
ОТВЕТА ПРИ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЕ ПОД ВЛИЯНИЕМ  
ЭКСТРАКТА OPISTHORCHIS FELINEUS**

**03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология**

**14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология**

**Автореферат**

**диссертации на соискание ученой степени**

**кандидата медицинских наук**

**Томск - 2012**

Работа выполнена в Государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации

**Научные руководители:**

Доктор медицинских наук, профессор Логвинов Сергей Валентинович

Член-корреспондент РАМН  
доктор медицинских наук, профессор Огородова Людмила Михайловна

**Официальные оппоненты:**

Доктор медицинских наук, профессор Плешко Раиса Ивановна

Кандидат медицинских наук Мартынов Александр Игоревич

**Ведущая организация:** Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации

Защита состоится «   » \_\_\_\_\_ 2012 г. в \_\_\_\_<sup>00</sup> часов на заседании диссертационного совета Д 208.096.03 при ГБОУ ВПО Сибирский государственный медицинский университет Минздравсоцразвития России по адресу: 634050, г. Томск, Московский тр., 2

С диссертацией можно ознакомиться в научно-медицинской библиотеке ГБОУ ВПО Сибирский государственный медицинский университет Минздравсоцразвития России

Автореферат разослан «   » \_\_\_\_\_ 2012 г.

Ученый секретарь диссертационного совета



А.В. Герасимов

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность проблемы.** Дендритные клетки (ДК) являются наиболее эффективными антигенпредставляющими клетками, способными к индукции наивных Т-клеток. Среди ДК выделяют отдельные подмножества клеток, характеризующиеся стратегическим расположением в тканях и экспрессией определенных типов рецепторов и молекул костимуляции при взаимодействии с различными стимулами [Wu L. et al., 2007; Smits H. et al., 2010; Zhou H. et al., 2012]. В настоящее время изучение иммунофенотипических и функциональных особенностей антигенпредставляющих дендритных клеток при различных заболеваниях представляет существенный интерес с позиции их дальнейшего применения для разработки подходов к терапии на основе клеточных технологий [Черных Е.Р. и др., 2009; Kozlov V.A. et al., 2009].

В литературе имеются сведения о роли ДК при формировании бронхиальной астмы в условиях паразитарной инвазии [Smiths H. et al., 2010; Jeong Y.I. et al., 2011]. Инфекционные агенты, в том числе гельминты, содержат различные сигнальные молекулы, которые взаимодействуют с дендритными клетками, передающими сигналы наивным Т-клеткам и направляющим их развитие на различные популяции регуляторных Т-клеток [Dudziak D. et al., 2007; Jeong Y. I. et al., 2011].

Научной концепцией настоящего исследования является предположение о том, что развитие бронхиальной астмы на фоне гельминтной инвазии ассоциировано с регуляторными механизмами, приводящими к ослаблению интенсивности аллергического иммунного ответа. К таким возможным механизмам относится изменение функционирования регуляторных Т-клеток, определенный иммунофенотип и активность ДК при инфекционном воздействии, индивидуальный вклад эпителиальных клеток воздухоносных путей в защиту от аллергических болезней [Sha Q. et al., 2004; Yazdanbakhsh, M. et al.2004]. Выяснение механизмов, с помощью которых гельминты способны оказывать супрессорный эффект в условиях развивающегося аллергического воспаления является важным и актуальным в связи с широким распространением заболеваемости описторхозом на территории России.

ДК являются ключевыми антигенпредставляющими клетками в индукции и поддержании аллергического воспаления [Agrawal D.K. et al., 2010]. Наряду с этим, они представляют собой наиболее привлекательную мишень для разработки современных подходов к терапии с использованием клеточных технологий.

**Цель:** установить закономерности изменений иммунофенотипических и морфо-функциональных характеристик дендритных клеток в иммунном ответе при бронхиальной астме в условиях стимуляции экстрактом *Opisthorchis felineus* in vitro.

**Задачи:**

1. Проанализировать иммунофенотипические особенности зрелых дендритных клеток по экспрессии маркеров CD209, CD83, CD86, HLA-DR при легкой и тяжелой бронхиальной астме по сравнению с показателями здоровых лиц.
2. Выявить особенности экспрессии фенотипических маркеров дендритных клеток при легкой и тяжелой бронхиальной астме в условиях стимуляции экстрактом *Opisthorchis felineus* in vitro.
3. Оценить секрецию цитокинов (IL-4, IL-10, IL-12, IFN- $\gamma$  и TGF- $\beta$ ) в супернатантах культур дендритных клеток при стимуляции экстрактом *Opisthorchis felineus* in vitro.
4. Определить содержание регуляторных Т-клеток и их фенотипические особенности при легкой и тяжелой бронхиальной астме для оценки иммунорегуляторных клеточных механизмов контроля аллергического воспаления.

**Научная новизна.** Впервые дана сравнительная характеристика иммуногенных свойств экстракта *Opisthorchis felineus* при бронхиальной астме различной тяжести с использованием антигенпредставляющих дендритных клеток in vitro. Получены новые данные о влиянии *Opisthorchis felineus* на экспрессию поверхностных маркеров дендритных клеток (CD209, HLA-DR, CD83, CD86) и секрецию цитокинов (IL-4, IL-10, IL-12, IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$ ) в супернатантах. В условиях стимуляции дендритных клеток экстрактом *Opisthorchis felineus* in vitro выявлено ослабление экспрессии CD86 и снижение продукции IL-12 как при легкой, так и при тяжелой астме. Молекула CD86 может быть регуляторным фактором в костимуляции дендритных клеток, что позволяет рассматривать ее в качестве возможной фармакологической мишени для терапии аллергических болезней.

Впервые у больных легкой и тяжелой бронхиальной астмой определены иммунофенотипические и функциональные характеристики дендритных клеток моноцитарного происхождения in vitro. Выявлена более выраженная экспрессия молекул CD209, CD86 и HLA-DR на поверхности дендритных клеток при легкой и тяжелой астме по сравнению с показателями здоровых лиц. В работе установлено существование провоспалительного биологического эффекта костимуляторной молекулы CD86 и ее способность к поддержанию аллергического воспаления, опосредованного усиленной продукцией IL-4.

В настоящем исследовании продемонстрированы не изученные ранее фенотипические характеристики регуляторных Т-клеток и особенности экспрессии внутриклеточного транскрипционного фактора FoxP3 при легкой и тяжелой бронхиальной астме с позиции их регуляторного воздействия на формирование иммунного ответа. При персистирующей антигенной стимуляции аэроаллергенами воздухоносных путей выявлено более высокое содержание CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> клеток и выраженная экспрессия FoxP3, подтверждающая существование иммунорегуляторных клеточных механизмов контроля аллергического воспаления.

**Практическая значимость.** Полученные результаты об ослаблении экспрессии CD86 на поверхности дендритных клеток при стимуляции экстрактом *Opisthorchis felineus in vitro* подтверждают возможность регуляции аллергического воспаления посредством изменения костимуляции дендритных клеток. Это позволяет рассматривать молекулу CD86 в качестве возможной фармакологической мишени для контроля воспаления. Терапевтическое ингибиторное воздействие на костимуляторные молекулы дендритных клеток предполагает возможность разработки технологий управления иммунным ответом на основе клеточной регуляции.

В связи с активной разработкой методов клеточной терапии на основе T-регуляторных клеток, выявленные в настоящей работе особенности экспрессии фенотипических маркеров регуляторных T-клеток при легкой и тяжелой бронхиальной астме необходимо учитывать при разработке фармакологической стратегии лечения заболеваний, в том числе аллергического воспаления.

Используемые в настоящей работе цитологические и иммунологические методы могут быть рекомендованы для включения в программу подготовки курсовых и дипломных работ студентов на базе подразделения клеточных технологий и иммунологии Научно-образовательного центра «Иммуногенетика и иммуноэпидемиология аллергических заболеваний в мировых очагах инфекций» ГБОУ ВПО СибГМУ Минздравсоцразвития России.

#### **Положения, выносимые на защиту:**

1. Зрелые дендритные клетки, генерированные из моноцитов венозной крови человека *in vitro*, обладают различными иммунофенотипическими и функциональными свойствами, в зависимости от тяжести бронхиальной астмы и присутствия в культуральной среде экстракта *Opisthorchis felineus*. При тяжелой бронхиальной астме фенотип и функциональные признаки дендритных клеток отличаются от соответствующих показателей больных легкой астмой и здоровых людей более выраженной экспрессией поверхностных молекул CD209, CD86 и высокими значениями секреции IL-4, IL-10 и TGF- $\beta$  в клеточных супернатантах.
2. При стимуляции дендритных клеток паразитарным экстрактом *Opisthorchis felineus in vitro* происходит ослабление экспрессии костимуляторной молекулы CD86 при легкой и тяжелой бронхиальной астме, а также снижение секреции IL-12 в супернатантах. При легкой астме выявлена более интенсивная продукция IL-10 дендритными клетками. Данные изменения свидетельствуют о возможности существования супрессивного эффекта экстракта *Opisthorchis felineus* на иммунный ответ при бронхиальной астме.

**Апробация работы.** Основные результаты диссертационной работы доложены и обсуждены на XXI Европейском ежегодном респираторном конгрессе (Амстердам, 2011); XII открытой итоговой научно-практической конференции студентов и молодых ученых с международным участием «Молодежь и медицинская наука в XXI веке» (Киров, 2011); юбилейной

научно-практической конференции молодых ученых, посвященной 60-летию работы Новокузнецкого ГИДУВа в Кузбассе (Новокузнецк, 2011); XII Российском конгрессе молодых ученых с международным участием «Науки о человеке» (Томск, 2011); VII Международной (XVI Всероссийской) Пироговской научно - медицинской конференции студентов и молодых учёных (Москва, 2012); XVI Конгрессе педиатров России с международным участием «Актуальные проблемы педиатрии» (Москва, 2012); научных семинарах подразделений Центральной научно-исследовательской лаборатории (Томск, 2009-2012) и совещании кафедры гистологии, эмбриологии и цитологии (Томск, 2012) ГБОУ ВПО СибГМУ Минздравсоцразвития России.

**Внедрение полученных результатов.** Результаты диссертации и основные методические подходы используются в работе подразделения клеточных технологий и иммунологии Научно-образовательного центра «Иммуногенетика и иммуноэпидемиология аллергических заболеваний в мировых очагах инфекций». Результаты работы применяются в учебном процессе кафедры гистологии, эмбриологии и цитологии, кафедры морфологии и общей патологии, кафедры иммунологии и аллергологии ГБОУ ВПО СибГМУ Минздравсоцразвития России для студентов лечебного, педиатрического и медико-биологического факультетов. Используемые иммунологические методы изложены в Методических рекомендациях для врачей-лаборантов «Культивирование дендритных клеток человека для исследования иммуногенных свойств антигена инфекционного происхождения (*Opisthorchis felineus*)», издательство ГОУ ВПО СибГМУ, Томск, 2009 г.

**Публикации.** По теме диссертации опубликованы 14 работ, в том числе 5 полнотекстовых журнальных статей в изданиях, рекомендованных ВАК РФ. Оформлено заявление на выдачу патента Российской Федерации на изобретение «Способ нагрузки дендритных клеток антигеном инфекционного происхождения *Opisthorchis felineus*» от 29 декабря 2011 г. (регистрационный номер заявки 2011154555).

**Объем и структура диссертации.** Работа изложена на 147 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы (глава 1), материалов и методов исследования (глава 2), результатов собственных исследований (глава 3), обсуждения результатов исследования (глава 4), заключения, выводов, практических рекомендаций, списка литературы. Диссертация иллюстрирована 27 рисунками и 14 таблицами. Библиографический список содержит 222 работы, из которых 180 принадлежит зарубежным авторам.

## **МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

**Объект исследования.** Исследование проводили на базе Научно-образовательного центра «Иммуногенетика и иммуноэпидемиология аллергических заболеваний в мировых очагах инфекций» ГБОУ ВПО СибГМУ

Минздравсоцразвития России (г. Томск). Часть работы с использованием цитологических и морфологических методов выполняли на кафедре гистологии, эмбриологии и цитологии ГБОУ ВПО СибГМУ Минздравсоцразвития России и на базе лаборатории биологических моделей (руководитель лаборатории – к.б.н. Иванов В.В.). Освоение методики культивирования дендритных клеток из моноцитов венозной крови человека в условиях стимуляции *Opisthorchis felinus* *in vitro* осуществлено в Медицинском Центре Лейденского Университета в отделе паразитологии (руководитель – профессор М. Язданбакш) на средства тревел-гранта «EAACI & GA2LEN Exchange Research Fellowships», поддержанного Европейской Академией Аллергологии и Клинической Иммунологии (EAACI).

Исследование осуществляли на основе протокола, одобренного локальным комитетом по этике ГОУ ВПО СибГМУ Росздрава г. Томска (заключение № 859 от 15.09.2008). Работа выполнена при частичной финансовой поддержке грантов РФФИ 08-04-99099; «EuroPrevall» FP6-2006-TTC-TU-5; ФЦП ГК № 16.512.11.2249; ФЦП ГК № 02.740.11.0716.

Клиническое обследование пациентов проводили на базе отделения пульмонологии ОГУЗ «Томская Областная клиническая больница» (г. Томск). В исследование включены взрослые пациенты с тяжелой ( $n = 24$ ) и легкой ( $n = 19$ ) бронхиальной астмой (БА). Группу сравнения составили 17 «практически здоровых» добровольцев (табл. 1).

Диагноз пациентам устанавливали на основании жалоб, данных аллергологического анамнеза и результатов клинического обследования. Включение больных БА проводили при условии соответствия международным стандартным критериям GINA 2009 [Global Initiative for Asthma (GINA), 2009], наличия сенсibilизации к пищевым, бытовым и пыльцевым аллергенам по данным скарификационного аллерготестирования, выявления отрицательных результатов анализа на описторхоз.

Приведенные клиничко-функциональные данные свидетельствуют, что все обследованные пациенты с диагнозом БА имели симптомы заболевания на момент включения в исследование. По результатам клинического обследования пациентов больные легкой и тяжелой БА, а также здоровые добровольцы были сопоставимы по возрасту и полу (табл. 1).

**Материал исследования.** Периферическую венозную кровь пациентов и здоровых волонтеров собирали из локтевой вены утром натощак в стерильную вакуумную пробирку с гепарином (Green Vac-Tube с Li-гепарином, 16\*100 мм, «Green Cross», Корея) в объеме 40 мл. Кровь в течение часа доставляли в ЦНИЛ СибГМУ для последующего иммунологического и морфологического исследования.

**Методы исследования.** Культуральные методы. Из гепаринизированной крови выделяли мононуклеары в градиенте плотности фиколла (пл. 1,077 г/см<sup>3</sup>, ПанЭко, Россия) по описанной методике. В двойном градиенте плотности перколла (пл. 1,131 г/см<sup>3</sup>, рН=8.5–9.5, «Sigma», США) получали моноциты периферической крови. Собранные моноциты использовали для культивирования ДК по описанному протоколу [Рыжов С.В. и соавт., 2011].

Характеристика групп пациентов, включенных в исследование, Me (Q1 - Q3)

Параметр		Группа контроля (n=17)		Больные бронхиальной астмой (БА)	
				Легкая БА (n=19)	Тяжелая БА (n=24)
Пол	муж	Абс	9	8	10
		%	52,90	42,10	41,60
	жен	Абс	8	11	14
		%	47,10	57,90	58,40
Возраст (лет)			35,00 (30,00 - 37,00)	34,00 (31,50 - 47,50)	41,50 (35,00 - 45,00)
ОФВ <sub>1</sub> (л/мин)			3,69 (3,36 - 4,72)	3,97 (3,00 - 4,76)**	1,78 (1,40 - 2,50)*
ОФВ <sub>1</sub> (%)			104,00 (98,0;111,00)	101,00 (94,79 - 111,00)**	66,60 (48,97 - 70,73)*
ФЖЕЛ (л)			4,18 (3,85 - 5,42)	4,40 (3,59 - 5,78)**	2,61 (2,15 - 3,40)*
ФЖЕЛ (%)			100,00 (96,00 - 106,00)	109,00 (101,26 - 116,00)**	75,89 (67,15 - 83,90)*
ПСВ (%)			117,06 (108,78 - 143,93)*	96,75 (88,30 - 104,00)**	55,37 (52,26 - 72,10)*
ПСВ (л/мин)			570,0 (485,00 - 600,00)	510,00 (470,00 - 570,00)**	360,00 (325,00 - 450,00)*

Примечание:

\*  $p < 0,05$  по сравнению с показателями в группе контроля.

\*\*  $p < 0,05$  по сравнению с показателями в группе тяжелой БА.

Цитологическое исследование. Морфологическую характеристику клеток культуральной взвеси осуществляли с помощью инвертированного микроскопа («Биомед», Россия). Фотографирование клеток в суспензии проводили с помощью цифровой камеры DCM 510 (5M pixels, ScopeTek Opto-Electric). Осуществляли приготовление мазков культуральной взвеси и клеток, прилипших ко дну культурального планшета. Фиксацию мазков клеточных культур проводили с помощью метилового спирта. Процедуру окраски осуществляли согласно описанному способу с использованием гематоксилина и эозина, а также метилового зелёного и пиронина по Браше с целью выявления РНК [Лили Р.Д., 1969]. Фотографирование окрашенных мазков проводили с использованием системы Axiovision 4 (Carl Zeiss, Германия).

Метод проточной цитофлуориметрии. Исследование экспрессии поверхностных кластеров детерминации ДК и регуляторных Т-клеток (T-reg) проводили при помощи соответствующих моноклональных антител на проточном цитометре FacsCalibur (Becton Dickinson, США).

На поверхности ДК определяли экспрессию CD209, костимулирующей молекулы - CD86/B7-2 (FITC, «BD Pharmingen<sup>TM</sup>», США); молекулы антигенного представления HLA-DR (FITC, «BD Biosciences», США) и маркера терминальной дифференцировки — CD83 (PE, «BD Pharmingen<sup>TM</sup>», США). Оценку жизнеспособности клеток проводили с использованием красителя 7-AAD (BD Biosciences, США). Иммунофенотипические особенности T-reg оценивали по вариации поверхностных и внутриклеточных маркеров с использованием флуорохром-конъюгированных моноклональных антител CD4 (FITC, «Сорбент», Россия), CD25 (PE-Cy7, № 335824, BD Biosciences, США) и FoxP3 (PE, № 556855, BD Pharmingen<sup>TM</sup>, США), (рис. 1). Внутриклеточную экспрессию FoxP3 определяли с использованием процедуры пермеабиллизации клеток. Протокол мечения мононуклеаров поверхностными и внутриклеточными моноклональными антителами для анализа иммунофенотипа T-reg любезно предоставлен коллегами из ГУ НИИКИ СО РАМН, г. Новосибирск [Курганова Е.В., Черных Е.Р. и др., 2009].

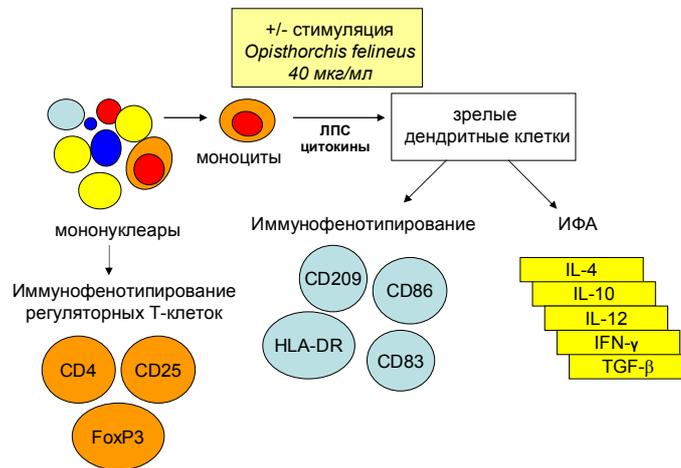


Рис. 1. Схема оценки функциональной поляризации дендритных клеток и фенотипа регуляторных Т-клеток у больных бронхиальной астмой различной тяжести и здоровых лиц

Оценка цитокинового профиля. Определение содержания IL-4, IL-10, IL-12, IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$  в супернатантах культур зрелых ДК в условиях стимуляции экстрактом *Opisthorchis felineus* in vitro (рис. 1) проводили методом твёрдофазного иммуноферментного анализа с использованием тест-систем («Вектор-Бест», Россия; «Biosource», Бельгия) согласно инструкциям, приложенным к наборам. Получение экстракта *Opisthorchis felineus* проводили согласно описанному способу [Deelder A.M. et al., 1980].

Статистическая обработка результатов. Для статистических расчетов использовали пакет программ «SPSS for Windows 15,0». Проверку на соответствие выборок нормальному закону распределения осуществляли с помощью критерия Шапиро-Вилка. Количественные данные в тексте и таблицах представляли в виде медианы (интерквартильных интервалов) - Ме

(Q1-Q3); качественные данные - в виде абсолютных и относительных частот (%). Сравнение количественных показателей, не подчиняющихся нормальному закону распределения, осуществляли при помощи непараметрического критерия Манна-Уитни. Межгрупповые различия данных в трех независимых группах оценивали с помощью критерия Крускала-Уоллиса. Для анализа зависимых данных использовали критерий Вилкоксона. Степень взаимосвязи между признаками оценивали, вычисляя коэффициент ранговой корреляции Спирмена. Анализ качественных данных проводили с использованием точного критерия Фишера [26]. Критической величиной уровня значимости различий считали  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для формирования полноценного иммунного ответа, в том числе противoinфекционного, требуются антигенпредставляющие клетки, среди которых наиболее важными являются ДК. ДК играют первостепенную роль в инициации адаптивного иммунного ответа. Для выяснения механизмов, с помощью которых гельминты влияют на аллергическое воспаление, проводят исследования на модели ДК, генерированных *in vitro*, в условиях их нагрузки паразитарными антигенами [Dudziak D. et al., 2007; Jeong Y. I. et al., 2011].

В рамках настоящей работы установлены особенности влияния экстракта *Opisthorchis felinus* (O.f.) *in vitro* на модификацию иммунного ответа при БА с участием антигенпредставляющих ДК. У больных БА различной тяжести проведена сравнительная фенотипическая и функциональная характеристика ДК до и после стимуляции паразитарным экстрактом O.f. *in vitro* и определен уровень продукции цитокинов в клеточных супернатантах.

В схему эксперимента были включены следующие варианты культивирования:

- 1) выращивание ДК *in vitro* в присутствии ЛПС (1 мкг/мл) с целью индукции созревания клеток. Процесс созревания способствует выработке цитокинов дендритными клетками и позволяет им в дальнейшем праймировать наивные Т-клетки в Т-хелперы при отсутствии какой-либо поляризующей активности;
- 2) стимуляция ДК *in vitro* с помощью паразитарного экстракта O.f. (40 мкг/мл) в присутствии ЛПС (1 мкг/мл). Добавление в культуральную среду O.f. способствует развитию поляризующей активности ДК за счет модифицирующего антигенного влияния на фенотип ДК.

### Морфологическая и цитологическая характеристика дендритных клеток

Моноциты являются общепринятым источником для культивирования ДК *in vitro*. Для подтверждения дифференцировки моноцитов в ДК, на первом этапе установлены морфологические и цитологические особенности ДК при БА различной тяжести и у здоровых людей на различных стадиях культивирования.

Исследование особенностей ДК с помощью микроскопии показало, что уже на 3-и сутки инкубации *in vitro* клетки, получаемые из фракции моноцитов в условиях цитокиновой стимуляции, меняли свою морфологию. Появлялись

характерные для ДК цитоплазматические отростки. На 5-е сутки культивирования значительная часть клеточных колоний отделялась от дна культурального планшета, и клетки обнаруживались в суспензионной среде. На 6-е сутки ДК имели вид круглых крупных клеток с многочисленными тонкими цитоплазматическими отростками (рис. 2).

По данным ряда авторов, направленное культивирование моноцитов в течение 5-7 дней в присутствии IL-4 и GM-CSF действительно приводит к генерации ДК, обладающих характерными морфологическими особенностями. В исследовании Я.И. Исайкиной (2010) показано, что ДК, выращенные из моноцитов в течение 6 суток, представляли собой крупные клетки размером от 10 до 20 мкм неправильной формы, с ядром, смещенным к периферии. Клетки имели характерные трубчатые выросты или длинные тяжи цитоплазмы. В своей работе авторы указывают, что уже на 2-3 сутки моноциты чаще становились амебовидными по форме клетками [Исайкина Я.И. и соавт., 2010].

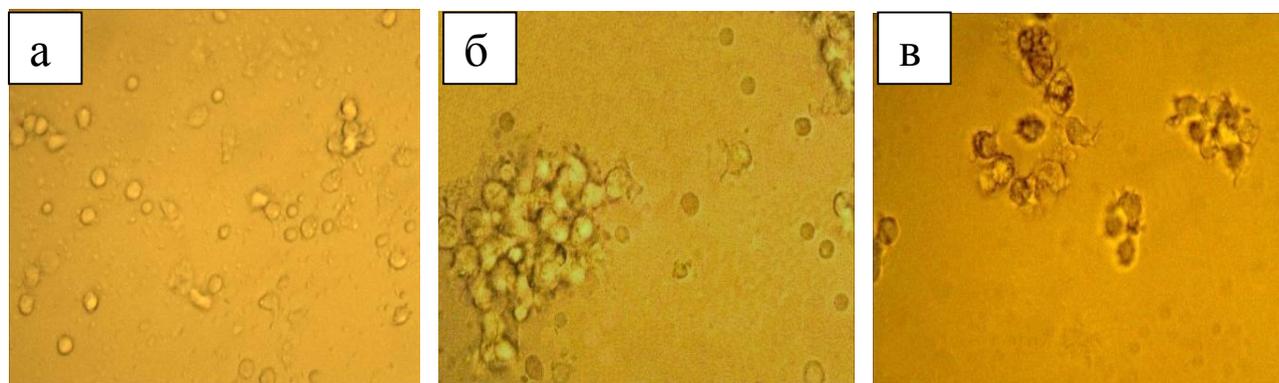


Рис. 2. Дендритные клетки в культуральной взвеси на различных стадиях инкубации с IL-4 и GM-CSF

а – монослой клеток через 1 час инкубации, ув.100; б – клетки и клеточные колонии на 1-е сутки инкубации, увел. 250; в – зрелые дендритные клетки в культуральной взвеси на 6-е сутки инкубации, ув. 250.

При цитологическом исследовании полученных в настоящей работе ДК установлено, что при окраске мазков культуральной взвеси метиловым зеленым и пиронином по Браше, цитоплазма ДК окрашивалась ярко пиронинофильно, что свидетельствовало о высоком содержании в ней РНК, и, следовательно, об активных синтетических процессах в клетках. Микрофотографии мазков клеток, окрашенных гематоксилином и эозином, подтверждали наличие на 6-е сутки культивирования дендритных клеток округлой или неправильной формы с эксцентрично расположенным базофильным ядром (рис. 3). При окраске ДК, прилипших ко дну культурального планшета, обнаруживались крупные клетки неправильной формы с характерными цитоплазматическими отростками.

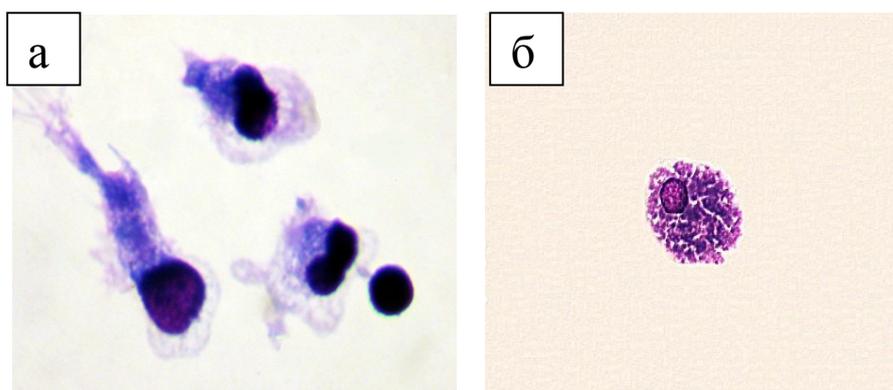


Рис. 3. Дендритные клетки, генерированные *in vitro* из моноцитов периферической крови в среде с IL-4 и GM-CSF

а - дендритные клетки, прилипшие к дну культурального планшета (3-и сутки культивирования). Окраска гематоксилином и эозином, ув.1000; б - мазок клеток культуральной взвеси на 6-е сутки культивирования. Окраска гематоксилином и эозином, ув. 900.

Таким образом, результаты морфологического и цитологического исследования подтверждают факт дифференцировки моноцитов в ДК *in vitro* в среде с IL-4 и GM-CSF. Зрелые ДК больных легкой, тяжелой БА и здоровых лиц обладают сходными цитологическими характеристиками. Полученные результаты не противоречат известным из научной литературы данным, касающимся морфологических особенностей ДК, генерированных из моноцитов *in vitro* при указанной цитокиновой стимуляции.

#### Имунофенотипическая характеристика дендритных клеток в условиях стимуляции экстрактом *Opisthorchis felinus in vitro*

Функционирование ДК связано с захватом, обработкой и представлением антигенов, благодаря чему информация о характере патогена передается наивным Т-клеткам и происходит формирование иммунного ответа. В зависимости от типа чужеродного сигнала, передаваемого наивным Т-лимфоцитам, они могут дифференцироваться в Th1, характеризующиеся секрецией таких цитокинов, как IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-12; либо в Th2, продуцирующие IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 [Dudziak D. et al., 2007].

В индукции и дифференцировке наивных Т-лимфоцитов важны многие факторы, такие как тип и доза поступающих антигенов, генетический фон организма - хозяина, путь антигенного воздействия [Holt, P. G. et al., 2008]. Критическое значение в определении направленности иммунного ответа имеет функционирование самих ДК. В настоящее время остаются невыясненными молекулярные маркеры, посредством которых ДК способны регулировать направленность иммунного ответа при воспалении в условиях антигенной нагрузки. В связи с этим, в работе выполнен сравнительный анализ фенотипических характеристик ДК при БА различной тяжести после стимуляции паразитарным экстрактом О.ф. *in vitro*. Не менее важное значение имеет факт установления различий в экспрессии поверхностных маркеров ДК и

продуцируемых цитокинов при легкой и тяжелой БА, что также влияет на дальнейшую поляризацию Т-лимфоцитов.

Для сравнения количественного выхода зрелых ДК, дифференцированных из моноцитов, было проведено исследование экспрессии поверхностных маркеров при БА различной тяжести и у здоровых лиц.

Иммуногенные свойства экстракта *O.f.* и его влияние на аллергическое воспаление оценены *in vitro* при совместном культивировании с ДК, полученными от пациентов с легкой и тяжелой БА, а также здоровых лиц. В работе проанализированы межгрупповые статистически значимые различия по всем изучаемым параметрам, а также внутригрупповые различия по содержанию CD-маркеров на поверхности ДК, стимулированных и не стимулированных паразитарным экстрактом *O.f. in vitro*.

Молекулу CD209 из семейства С-типа лектиновых рецепторов относят к специфичным мембран-ассоциированным молекулам адгезии ДК. Функционирование CD209 связано со взаимодействием и интернализацией различных антигенов для последующего процессинга и представления наивным Т-клеткам [M. Relloso et al., 2002]. В проведенном нами исследовании культивирование моноцитов периферической крови при добавлении IL-4 и GM-CSF *in vitro* приводило к генерации ДК, экспрессирующих на поверхности молекулу CD209. В отсутствие стимуляции экстрактом *O.f. in vitro* при легкой и тяжелой БА установлена более выраженная экспрессия CD209<sup>+</sup> по сравнению с показателями здоровых лиц (табл. 2-4). Повышение содержания CD209<sup>+</sup> клеток, возможно, связано с высоким уровнем IL-4 при легкой и тяжелой астме, что также подтверждалось обнаруженной положительной корреляционной взаимосвязью между этими показателями.

Таблица 2

Экспрессия фенотипических маркеров дендритных клеток в группе легкой бронхиальной астмы (n=19) при различных вариантах стимуляции  
Me (Q1 -Q3), %

Варианты стимуляции	CD209 <sup>+</sup>	CD83 <sup>+</sup>	CD86 <sup>+</sup>	HLA-DR <sup>+</sup> CD209 <sup>+</sup>	CD86 <sup>+</sup> CD209 <sup>+</sup>
ДК ЛПС	24,76 (22,74– 38,79)	22,15 (14,13– 24,53)	37,30 (30,97– 44,06)	93,99 (78,52–95,54)	21,63 (21,44–26,62)
ДК ЛПС O.f.	28,08 (25,01– 37,20)	5,56 (2,52– 9,37)*	23,18 (15,02– 36,66)*	72,84 (51,76–94,66)	17,19 (12,57–31,04)

Примечание.

\*- достигнутый уровень значимости различий внутри группы при разных вариантах стимуляции

При анализе влияния паразитарного экстракта *O.f. in vitro* на экспрессию CD209<sup>+</sup> дендритными клетками выявлена тенденция к увеличению содержания CD209<sup>+</sup> клеток, как при легкой, так и тяжелой БА. Из данных литературы известно, что высокие значения продукции IFN- $\gamma$  и TGF- $\beta$  негативно

ассоциированы с экспрессией молекулы CD209 на ДК [M. Relloso et al., 2002]. При уменьшении количества этих цитокинов в клеточных культурах ожидается повышение относительного содержания CD209<sup>+</sup>, что и было установлено в настоящем исследовании. В условиях стимуляции экстрактом O.f. *in vitro* при легкой и тяжелой астме происходило повышение экспрессии молекулы CD209 на поверхности ДК, вероятно, связанное с низкой секрецией IFN- $\gamma$  и TGF- $\beta$  в культурах дендритных клеток, полученных у этих пациентов.

При аллергическом воспалении важную роль играют активированные Т-лимфоциты, секретирующие цитокины Th2 направленности. Активация Т-клеток зависит от представления антигенов профессиональными антиген-презентирующими клетками в комплексе с молекулами главного комплекса гистосовместимости (HLA-DR). Молекулы HLA-DR в незрелых ДК рециркулируют между лизосомами и клеточной мембраной. Созревание ДК сопровождается снижением пула циркулирующих внутри клетки молекул и их накоплением на клеточной поверхности в виде комплексов антиген-HLA-DR [Гусакова Н.В. и соавт., 2004; Cella M. et al., 2009].

В ходе проведенных экспериментов выявлено, что как при легкой, так и при тяжелой астме в отсутствие стимуляции экстрактом O.f. *in vitro* содержание HLA-DR<sup>+</sup>CD209<sup>+</sup> клеток оказалось выше значений, полученных в контроле (табл. 2-4). При добавлении паразитарного экстракта O.f. в культуральную среду экспрессия молекул HLA-DR на ДК при легкой и тяжелой астме оставалась выше значений контроля. Внутригрупповой анализ продемонстрировал максимальное увеличение содержания маркеров HLA-DR<sup>+</sup>CD209<sup>+</sup> на поверхности ДК больных тяжелой БА после добавления в культуральную среду экстракта O.f. по сравнению со значениями в этой группе вне стимуляции. Полученные результаты согласуются с данными литературы о том, что в условиях гельминтной стимуляции нагрузки выявляется повышение экспрессии HLA-DR<sup>+</sup> на поверхности ДК. Так, R. R. Oliveira с коллегами (2009) в своей работе показали, что инфекция, вызванная *Schistosoma mansoni*, приводит к повышению относительного содержания молекул HLA-DR<sup>+</sup> на ДК при астме [Oliveira, R. R. et al., 2009].

В литературе встречаются предположения авторов о том, что различная экспрессия фенотипических молекул ДК определяет их последующее влияние на поляризацию иммунного ответа при воспалении [Platinga, M., 2010]. Наиболее важными в этом процессе маркерами среди известных костимуляторных молекул ДК оказались члены семейства B7 – CD80 и CD86 [Balanescu A. et al., 2002]. В рамках настоящего исследования определена экспрессия молекул CD86<sup>+</sup> на поверхности ДК пациентов с легкой и тяжелой БА и в контроле. Кроме того, осуществлена сравнительная оценка указанных маркеров ДК в группах после добавления в культуральную среду экстракта O.f.

Полученные нами результаты демонстрируют, что содержание CD86<sup>+</sup> клеток при легкой и тяжелой БА в отсутствие стимуляции экстрактом O.f. *in vitro* оказалось статистически значимо выше значений контроля (табл. 2-4).

Таблица 3

Экспрессия фенотипических маркеров дендритных клеток в группе тяжелой бронхиальной астмы (n=24) при различных вариантах стимуляции Me (Q1 -Q3), %

Варианты стимуляции	CD209 <sup>+</sup>	CD83 <sup>+</sup>	CD86 <sup>+</sup>	HLA-DR <sup>+</sup> CD209 <sup>+</sup>	CD86 <sup>+</sup> CD209 <sup>+</sup>
ДК ЛПС	27,34 (19,84– 31,99)	14,34 (10,58– 15,02)	37,91 (32,13– 52,89)	77,57 (75,64–83,24)	32,48 (19,06–39,43)
ДК ЛПС O.f.	30,28 (21,07– 39,70)*	14,22 (13,10– 21,20)	33,25 (30,51– 41,74)	86,84 (83,39–87,05)	28,18 (18,32–37,18)

Примечание.

\*- достигнутый уровень значимости различий внутри группы при разных вариантах стимуляции

Таблица 4

Экспрессия фенотипических маркеров дендритных клеток в контроле (n=17) при различных вариантах стимуляции, Me (Q1 -Q3), %

Варианты стимуляции	CD209 <sup>+</sup>	CD83 <sup>+</sup>	CD86 <sup>+</sup>	HLA-DR <sup>+</sup> CD209 <sup>+</sup>	CD86 <sup>+</sup> CD209 <sup>+</sup>
ДК ЛПС	20,02 (16,76– 35,45)	17,17 (12,10– 19,25)	22,53 (17,22– 27,05)	64,24 (40,49–79,48)	19,66 (16,49–31,85)
ДК ЛПС O.f.	26,90 (19,37– 39,06)	17,37 (11,65– 20,79)	26,56 (17,98– 34,70)	69,01 (51,02–75,47)	11,87 (11,10– 19,63)*

Примечание.

\*- достигнутый уровень значимости различий внутри группы при разных вариантах стимуляции

Наши данные об изменении экспрессии CD86 на поверхности ДК частично согласуются с результатами, полученными в работе Xue-Qin Chen с коллегами (2006). Вероятно, костимуляторный сигнал, опосредованный молекулой CD86 на поверхности ДК, ответственен за последующую дифференцировку наивных Т-лимфоцитов в Th2 клетки, продуцирующих высокий уровень IL-4. В поддержку данного предположения есть несколько аргументов. Во-первых, с увеличением тяжести БА происходит повышение экспрессии CD86<sup>+</sup> на поверхности ДК. Возможно, это в дальнейшем приводит к индукции выработки IL-4 при бронхиальной астме, причем, чем тяжелее картина воспаления, тем более высокий уровень IL-4 выявляется в клеточных супернатантах, что частично продемонстрировано в исследовании Xue-Qin Chen в 2006 году [Xue-Qin Chen et al., 2006]. Во-вторых, в нашей работе обнаружена положительная корреляционная взаимосвязь между экспрессией CD86<sup>+</sup> на поверхности ДК и продукцией IL-4 в супернатантах клеточных культур. Кроме того, при тяжелой астме выявлена отрицательная

корреляционная зависимость между пиковой скоростью выдоха (%) и экспрессией CD86<sup>+</sup>CD209<sup>+</sup> на ДК. Чем тяжелее воспаление, тем ниже значения пиковой скорости выдоха при астме, и, следовательно, выше экспрессия костимуляторной молекулы CD86<sup>+</sup>, которая, является ответственной за поддержание аллергического воспаления.

В условиях стимуляции ДК паразитарным экстрактом *O.f. in vitro* при легкой и тяжелой астме установлено существенное ослабление экспрессии молекулы CD86, причем в случае легкой БА оно оказалось статистически значимо ниже показателей, полученных в этой группе при культивировании ДК без добавления экстракта *O.f.* (табл.2). Можно предположить, что за счет уменьшения экспрессии поверхностных костимуляторных молекул CD80/CD86 при воспалении, гельминтные антигены вызывают ослабление возможности ДК контактировать с наивными Т-клетками. Недостаточно эффективное взаимодействие ДК с Т-лимфоцитами, ослабление либо полное отсутствие второго костимуляторного сигнала – все эти факторы могут приводить к снижению интенсивности аллергического воспаления при наличии инфекционной стимуляции.

С целью дополнительного иммунофенотипического контроля процесса генерации и функциональной зрелости ДК в условиях нагрузки экстрактом *O.f. in vitro* в настоящей работе проанализирована динамика экспрессии поверхностного антигена CD83 на ДК при БА различной тяжести и у здоровых людей (табл. 2-4). Созревание ДК является важнейшим моментом для индукции иммунного ответа. Трансмембранная молекула CD83 является наиболее характерным поверхностным антигеном зрелых ДК. В литературе встречаются данные об отсутствии различий в содержании CD83<sup>+</sup> ДК при аллергическом воспалении по сравнению с показателями контроля [Chen X. Q. et al., 2006]. Однако в ходе выполнения нашей работы установлено, что в отсутствие стимуляции ДК экстрактом *O.f. in vitro* наибольшая экспрессия молекулы CD83 наблюдается на ДК, полученных у больных легкой БА. По мнению некоторых авторов, экспрессия CD83 положительно коррелирует с уровнями CD86 и HLA-DR на поверхности ДК [Balanescu A. et al., 2002], с чем, возможно и связан обнаруженный нами высокая степень экспрессии CD83 на ДК при легкой астме. В условиях стимуляции ДК экстрактом *O.f. in vitro* выявлялось существенное снижение экспрессии CD83<sup>+</sup> при легкой БА и отсутствие выраженных изменений при тяжелой БА.

#### Динамика продукции цитокинов в клеточных супернатантах при воздействии экстрактом *Opisthorchis felinus in vitro*

Отдельный уровень регуляции функционирования иммунной системы связан с цитокинами, продуцируемыми дендритными клетками в ходе формирования иммунного ответа. Различная экспрессия фенотипических маркеров на ДК, тип вырабатываемых цитокинов определяют развитие субпопуляций эффекторных Т-клеток и, следовательно, дальнейшую поляризацию ответа.

В нашем исследовании установлены более высокие значения секреции IL-4 и IL-10 в супернатантах при легкой и тяжелой астме по сравнению с показателями, полученными в контроле. Продукция IL-12 при легкой и тяжелой БА оказалась статистически значимо ниже показателей здоровых доноров (табл. 5). Содержание IL-12 в клеточных культурах пациентов с легкой и тяжелой астмой снижалось, вероятно, за счет супрессорного действия IL-10, значения которого оказались повышенными при легкой и тяжелой астме.

Таблица 5

Содержание цитокинов в супернатантах клеточных культур при различных вариантах стимуляции, Me (Q1 -Q3), пг/мл

Группы	IL-4		IL-10		IL-12		TGF- $\beta$		IFN- $\gamma$	
	ДК ЛПС	ДК ЛПС O.f.	ДК ЛПС	ДК ЛПС O.f.	ДК ЛПС	ДК ЛПС O.f.	ДК ЛПС	ДК ЛПС O.f.	ДК ЛПС	ДК ЛПС O.f.
Легкая БА n=19	5,60	5,25	3,52	5,05	7,25	4,27	28,20	27,60	9,04(8,7	3,30
	(3,25 – 6,70)	(1,21– 6,51)	(3,00– 3,75)	(4,11– 5,66)*	(6,09– 10,52)	(3,25– 4,50)*	(27,80– 28,87)	(27,04 – 34,53)	5 – 13,51)	(2,75 – 3,45)*
					$p_{13}=0,002$	$p_{13}=0,008$	$p_{12}=0,001$		$p_{13}=0,006$	
Тяжелая БА n=24	7,25	3,45	4,58	2,76	11,51	5,53	55,53	28,41	12,05(8,	9,75(7,
	(4,75 – 10,25)	(1,25– 3,50)*	(3,53– 5,02)	(2,65– 2,76)	(9,72– 12,05)	(2,50– 7,00)*	(43,50– 58,01)	(26,45– 36,06)	48 – 12,75)	01 – 11,60)
				$p_{12}=0,049$	$p_{23}=0,001$	$p_{23}=0,018$	$p_{23}=0,001$		$p_{13}=0,008$	
Контроль n=17	4,20	4,32	2,78	4,33	16,20	8,37	28,50	29,91	3,72(1,2	3,42
	(3,55 – 6,01)	(3,04– 5,42)	(2,46– 3,45)	(3,32– 15,04)	(15,10 – 16,25)	(5,15– 10,10)*	(27,30– 29,20)	(28,07– 33,25)	2 – 4,79)	(1,45 – 5,18)
		$p_{23}=0,015$								

Примечание.

\*- статистически значимые различия внутри группы при разных вариантах стимуляции

$p_{12}$  - различия между показателями при легкой и тяжелой БА

$p_{13}$  - различия между показателями при легкой БА и в контроле

$p_{23}$  - различия между показателями при тяжелой БА и в контроле

IL-10 способствует снижению продукции IL-12 посредством активации ДК, макрофагов и натуральных киллеров. Считается, что повышенная концентрация IL-10 способствует уменьшению экспрессии костимуляторных

молекул CD80 и CD86 на ДК, что в конечном итоге приводит к снижению Т-клеточной активации [Tournou K. G. et al., 2000]. Однако в ходе выполнения настоящей работы у пациентов с БА этого явления не обнаружено. Даже в условиях более высоких значений продукции IL-10 в супернатантах клеточных культур при легкой и тяжелой БА, уровень экспрессии CD86 на поверхности ДК не снижался. Вероятно, при аллергическом воспалении не проявляется достаточно эффективного ингибиторного действия IL-10 на экспрессию поверхностных костимуляторных молекул ДК. Можно предположить, что регуляция эффективности костимуляторного сигнала при легкой и тяжелой астме ассоциирована с другими механизмами, не связанными с IL-10.

В ходе выполнения настоящей работы выявлено, что при стимуляции ДК экстрактом *O. f. in vitro* происходит снижение уровня IL-12 и IFN- $\gamma$  в клеточных супернатантах при легкой и тяжелой БА и усиление продукции IL-10 при легкой астме и в контроле, что подтверждает существование иммунорегуляторного воздействия экстракта *O.f.* Из литературы известно, что иммуногенные свойства родственного для *O.f.* вида *Clonorchis sinensis* проявляются способностью этого гельминта ингибировать секрецию провоспалительных цитокинов, включая IL-12 и IFN- $\gamma$  [Jeong Y. I. et al., 2011].

Можно предположить, что ингибиторный эффект экстракта *O.f.* при аллергическом воспалении связан с IL-10, обладающим супрессорным действием. Показано, что этот цитокин продуцируется дендритными клетками в ответ на различные инфекционные стимулы [Moore, K. W. et al., 2001]. На модели астмы у мышей продемонстрировано супрессорное влияние паразитарных агентов на бронхиальную реактивность и интенсивность аллергического воспаления посредством IL-10, что подтверждает выдвинутое предположение [Fallon, P. G. et al., 2005]. Кроме того, экстракт *O.f.* способен проявлять свои иммуногенные свойства при аллергическом воспалении посредством down-регуляции секреции IL-4, IL-12 и IFN- $\gamma$ . Продукция IL-12 и IFN- $\gamma$  снижалась практически в 2 раза при БА легкой и тяжелой БА после стимуляции ДК экстрактом *O.f. in vitro*. Секреция IL-10, напротив, имела тенденцию к увеличению в условиях стимуляции ДК экстрактом *O.f.* при легкой астме. Возможно, ослабление Th2 аллергического воспаления при инфекционной нагрузке происходит за счет снижения продукции IL-4 и повышения секреции IL-10.

#### Имунофенотипические особенности регуляторных Т-клеток при легкой и тяжелой бронхиальной астме

Кроме продукции цитокинов, существенная роль в механизмах формирования и регуляции иммунного ответа при бронхиальной астме принадлежит клеточному окружению. В литературе встречаются работы, посвященные фенотипическим характеристикам и функциональной активности Т-reg при различной патологии [Chatila, T.A., 2005].

Для оценки иммунорегуляторных клеточных механизмов контроля аллергического воспаления в рамках настоящей работы определено содержание Т-reg при БА различной тяжести и у здоровых людей. Установлено более

высокое содержание  $CD4^+CD25^{high}$  клеток в периферической крови больных легкой и тяжелой астмой по сравнению со значениями в контроле. При этом у пациентов с тяжелой астмой зафиксировано наибольшее содержание  $CD4^+CD25^{high}FoxP3^+$  клеток по сравнению с показателями при легкой БА и у здоровых доноров (рис. 4).

В рамках настоящей работы обнаружена более выраженная экспрессия FoxP3 среди  $CD4^+CD25^{high}$  клеток у пациентов с тяжелой БА по сравнению с легкой астмой. Возможным объяснением является формирование механизма обратной связи, в результате которого не происходит ожидаемого дефекта в системе FoxP3 при усилении интенсивности воспаления при бронхиальной астме. В рамках этой модели FoxP3 выступает в качестве транскрипционного регулятора иммуносупрессивной эффекторной программы T-reg. Важным является тот факт, что FoxP3 является ответственным за преобразование периферических регуляторных  $CD4^+$  T-клеток в дополнительный пул T-reg, так называемых «адаптивных» T-reg. При персистирующей антигенной стимуляции воздухоносных путей аэроаллергенами происходит повышение экспрессии FoxP3 за счет ответного механизма обратной связи, что ведет к последующему увеличению количества «адаптивных» T-reg у пациентов с более тяжелым статусом аллергического воспаления [Kasprowicz, D. J. et al., 2003].

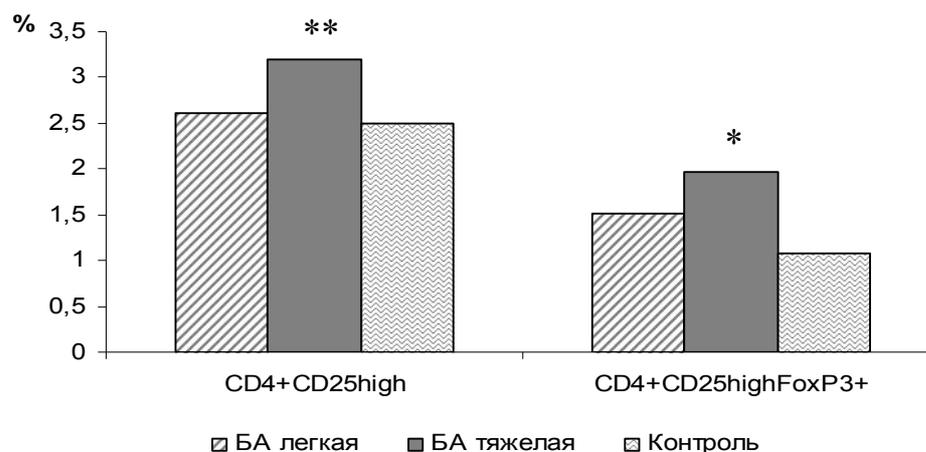


Рис. 4. Содержание регуляторных T-клеток у здоровых лиц и больных бронхиальной астмой различной тяжести, Me (Q1 - Q3)

Примечание:

\* - статистически значимые различия по сравнению с показателями группы тяжелой БА

\*\* - статистически значимые различия по сравнению с показателями контроля

Подтверждением вклада T-reg в клеточные механизмы формирования аллергического воспаления могут служить проведенные ранее исследования в СибГМУ (2009-2011 гг.) под руководством член-корр. РАМН, д.м.н, профессора Огородовой Л.М. Показано, что при бронхиальной астме на фоне инвазии *Opisthorchis felinus* происходит максимальное увеличение  $CD4^+CD25^{high}$  и  $CD4^+FoxP3^+$  регуляторных T-клеток по сравнению с показателями, полученными при изолированной астме и в контроле, что демонстрирует модифицирующее влияние *Opisthorchis felinus* на иммунный ответ при

аллергическом воспалении. Т-регуляторные клетки, через цитокин-опосредованный механизм, ингибируют Th2 иммунный ответ, снижают уровень провоспалительных цитокинов и, как следствие, подавляют аллергическое воспаление [Елисеева О.В., Огородова Л.М. и др., 2011].

Проведенное исследование имеет несколько важных научных результатов. Во-первых, в рамках работы получены новые фундаментальные данные о фенотипических характеристиках ДК при БА различной тяжести по сравнению с показателями здоровых лиц. Во-вторых, установлены особенности иммуногенного влияния экстракта *O. f. in vitro* на формирование воспаления при БА (рис. 5). В-третьих, изменение уровня Т-reg в периферической крови при астме подтверждает вклад иммунорегуляторных клеточных механизмов в контроль аллергического воспаления.

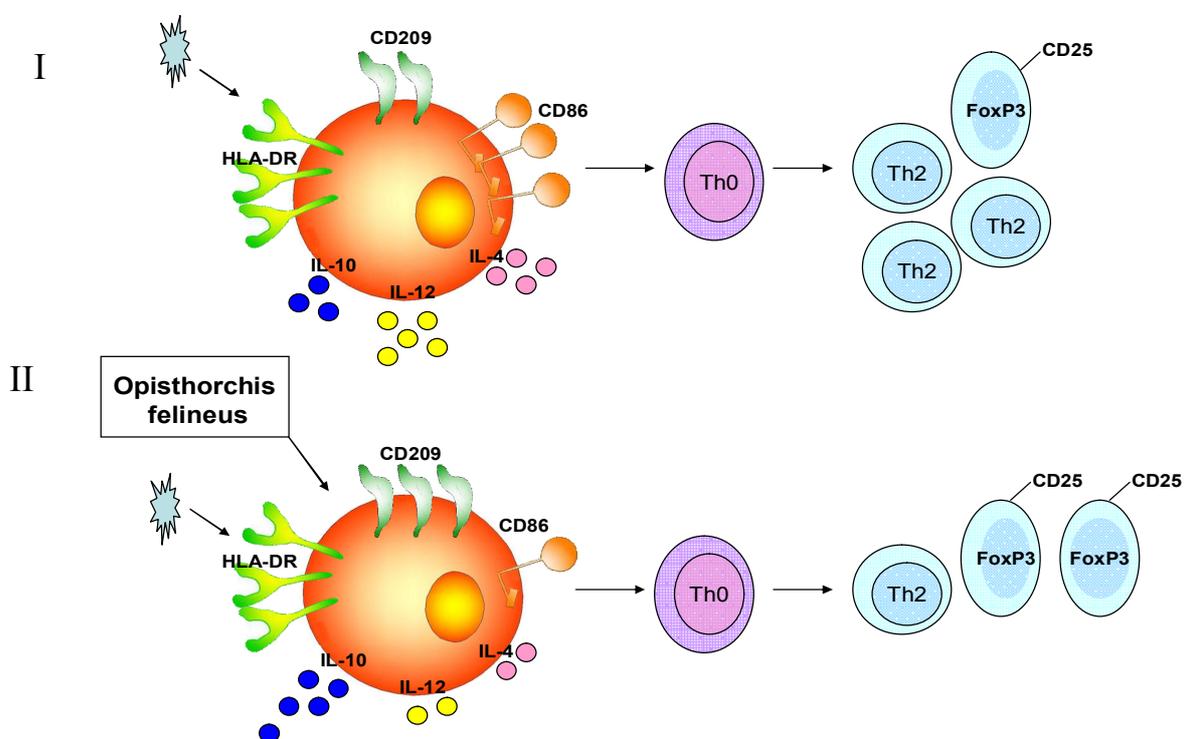


Рис. 5. Схема особенностей экспрессии фенотипических маркеров дендритных клеток и секреции цитокинов при аллергическом воспалении, установленная *in vitro* до (I) и после (II) стимуляции экстрактом *Opisthorchis felineus*

Таким образом, зрелые дендритные клетки, генерированные *in vitro* из моноцитов венозной крови больных легкой и тяжелой бронхиальной астмой, а также здоровых лиц, обладают сходными морфологическими особенностями и характеризуются как крупные клетки овальной либо неправильной формы, с эксцентрично расположенным ядром и наличием цитоплазматических отростков. На основании выявленных высоких значений экспрессии костимуляторной молекулы CD86 на ДК при астме можно заключить, что CD86 при аллергическом воспалении является провоспалительным биологическим маркером и способствует поддержанию Th2 направленности иммунного ответа

за счет индукции выработки ИЛ-4. Ослабление экспрессии CD86 при стимуляции экстрактом *O.f. in vitro* подтверждает возможность регуляции аллергического воспаления за счет изменения костимуляции дендритных клеток. Это позволяет рассматривать молекулу CD86 в качестве возможной фармакологической мишени для контроля воспаления.

### ВЫВОДЫ

1. Анализ иммунофенотипических особенностей зрелых дендритных клеток, установленных по экспрессии маркеров CD209, CD83, CD86, HLA-DR *in vitro* выявил более высокое содержание HLA-DR<sup>+</sup>CD209<sup>+</sup> и CD83<sup>+</sup> клеток при легкой бронхиальной астме и максимальную экспрессию CD86<sup>+</sup> на дендритных клетках при тяжелой астме по сравнению с показателями у здоровых лиц.
2. Изменения экспрессии иммунофенотипических маркеров дендритных клеток в условиях стимуляции экстрактом *Opisthorchis felineus in vitro* проявляются снижением количества CD86<sup>+</sup> клеток при легкой и тяжелой бронхиальной астме. Совместное культивирование дендритных клеток с экстрактом *Opisthorchis felineus in vitro* приводит к усилению экспрессии CD209<sup>+</sup> на дендритных клетках во всех обследованных группах, повышению содержания HLA-DR<sup>+</sup>CD209<sup>+</sup> клеток при тяжелой астме и снижению CD83<sup>+</sup> клеток при легкой бронхиальной астме по сравнению с исходными показателями в этих группах вне стимуляции экстрактом.
3. Легкая и тяжелая бронхиальная астма характеризуются исходно высокими значениями секреции ИЛ-4, ИЛ-10, IFN- $\gamma$  дендритными клетками и низким уровнем ИЛ-12 в клеточных супернатантах. Нагрузка дендритных клеток экстрактом *Opisthorchis felineus in vitro* вызывает существенное снижение продукции ИЛ-12 при легкой и тяжелой бронхиальной астме и увеличение ИЛ-10 при легкой астме при сопоставлении с показателями вне стимуляции экстрактом.
4. При легкой и тяжелой бронхиальной астме выявлено высокое содержание CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> регуляторных Т-клеток в периферической крови по сравнению с показателями здоровых лиц. У пациентов с тяжелой астмой наблюдается максимальная экспрессия внутриклеточного фактора FoxP3<sup>+</sup>, что подтверждает вклад регуляторной популяции Т-клеток в клеточные механизмы формирования аллергического воспаления.

### ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Установленная в ходе исследования динамика экспрессии CD86 на дендритных клетках при стимуляции экстрактом *Opisthorchis felineus in vitro* подтверждает возможность регуляции аллергического воспаления посредством изменения костимуляции дендритных клеток. Это позволяет рекомендовать молекулу CD86 в качестве возможной фармакологической мишени для контроля воспаления. Терапевтическое ингибиторное воздействие на молекулы костимуляции дендритных клеток позволит

разработать технологию управления иммунным ответом на основе клеточной регуляции.

2. С целью поиска новых молекулярных мишеней и установления типа поляризации иммунного ответа, характерного для экстракта *Opisthorchis felineus* в условиях аллергического воспаления, следует провести дополнительные исследования более широкого спектра рецепторов на поверхности дендритных клеток (в частности Toll-like рецепторов) и изучить динамику экспрессии иммунофенотипических клеточных маркеров на молекулярно-генетическом уровне.
3. В связи с активной разработкой методов клеточной терапии на основе Т-регуляторных клеток выявленные в настоящей работе особенности экспрессии фенотипических маркеров регуляторных Т-клеток при легкой и тяжелой бронхиальной астме необходимо учитывать при разработке фармакологической стратегии лечения заболеваний, в том числе аллергического воспаления.

#### **ПЕРЕЧЕНЬ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

1. Кремер Е.Э. Исследование иммунологических механизмов развития атопической патологии (бронхиальной астмы) на фоне хронической описторхозной инвазии [Текст] / Е.Э. Кремер // Сборник статей по материалам Всероссийской 66-й итоговой научной конференции им. Н.И. Пирогова.- Томск. – 2007. – С. 42 – 44.
2. Кремер Е.Э. Перспективы использования дендритных клеток в клинической практике [Текст] / Е.Э. Кремер, М.В. Васильева, Л.М. Огородова // Российский аллергологический журнал. – 2009. – №1. – С.30–38.
3. Влияние инвазии *Opisthorchis felineus* на иммунный ответ при бронхиальной астме [Текст] / Л.М. Огородова, М.Б. Фрейдин, А.Э. Сазонов, О.С. Федорова, И.А. Деев, Е.Э. Кремер // Бюллетень сибирской медицины. – 2010. – №3. – С.85–90.
4. Иммунорегуляторные Т-клетки при хронической обструктивной болезни легких и бронхиальной астме [Текст] / Л.М. Огородова, Г.Э. Черногорюк, И.А. Деев, Н.А. Кириллова, Е.Э. Кремер // Материалы V Национального конгресса терапевтов. – Москва. – 2010. – С. 288.
5. Субпопуляции Т-регуляторных клеток при бронхиальной астме и гетерогенных фенотипах хронической обструктивной болезни легких [Текст] // Н.А. Кириллова, И.А. Деев, Е.Э. Кремер и др. // Бюллетень сибирской медицины. – 2011. – №1. – С. 48 – 54.
6. Уровень Т-регуляторных клеток при разных фенотипах хронической обструктивной болезни легких [Текст] / Н.А. Кириллова, Е.Э. Кремер, И.А. Деев и др. // Терапевт. – 2011. – №2. – С. 45.
7. Клеточный иммунный ответ у детей, страдающих бронхиальной астмой в сочетании с хронической описторхозной инвазией [Текст] / О.В. Елисеева, Е.Э. Кремер, Л.М. Огородова, и др. // Вопросы диагностики в педиатрии. – 2011. – Т.3. – №2. – С. 15–19.
8. Increased levels of CD4+CD25high and CD4+FoxP3+ T-regulatory cells (Tregs) in patients with different severity of bronchial asthma (BA) [Текст] / Е.Э. Кремер, Н.А. Кириллова, С.В. Федосенко и др. // Сборник тезисов XXI Европейского ежегодного респираторного конгресса. – Амстердам. – 2011г. – С. 696.
9. Comparative characteristics of regulatory T cells populations between patients with bronchial asthma (BA) and COPD [Текст] / Е.Э. Кремер, Н.А. Кириллова, Т.В. Перевозчикова и др. // Сборник тезисов XXI Европейского ежегодного респираторного конгресса. – Амстердам. – 2011г. – С. 318.

10. Кремер Е.Э. Субпопуляции регуляторных Т-клеток у больных бронхиальной астмой различной степени тяжести [Текст] / Е.Э. Кремер, Н.А. Кириллова, И.А. Деев // Сборник XII-ой открытой итоговой научно-практической конференции студентов и молодых ученых с международным участием «Молодежь и медицинская наука в XXI веке». –Киров. – 2011. – С. 181.
11. Кремер Е.Э. Фенотипическая характеристика регуляторных Т-клеток при легкой и тяжелой степени бронхиальной астмы [Текст] / Е.Э. Кремер, Л.М. Огородова, С.В. Логвинов // Сборник материалов юбилейной научно-практической конференции молодых ученых, посвященной 60-летию работы Новокузнецкого ГИДУВа в Кузбассе. – Новокузнецк. – 2011. – С.62–64.
12. Кремер Е.Э. Механизмы down-регуляции аллергического воспаления с участием регуляторных Т-клеток [Текст] / Е.Э. Кремер, Н.А. Кириллова, И.А. Деев // Сборник статей по материалам XII Российского конгресса молодых ученых с международным участием «Науки о человеке». – Томск. – 2011. – С.23–24.
13. **Содержание регуляторных Т-клеток в периферической крови у пациентов с бронхиальной астмой [Текст] / Е.Э. Кремер, Н.А. Кириллова, Н.В. Теплова и др. // Российский аллергологический журнал. – 2011. – №5. – С.21–25.**
14. Иммунофенотипические особенности дендритных клеток больных бронхиальной астмой в условиях стимуляции *Opisthorchis felinus* [Текст] / Е.Э. Кремер, Н.А. Кириллова, Л.М. Огородова и др. // Сборник статей по материалам VII Международной (XVI Всероссийской) Пироговской научно- медицинской конференции студентов и молодых учёных. – Москва. – 2012. – С. 203.

#### Условные сокращения

БА	– бронхиальная астма
ДК	– дендритные клетки
ЛПС	– липополисахарид
ЭТС	– эмбриональная телячья сыворотка
CD	– cluster of differentiation (кластер дифференцировки)
FITC	– флюоресцеин изотиоцианат
GM-CSF	– гранулоцитарно-моноцитарный колониестимулирующий фактор
GINA	– Global Initiative for asthma (регламентирующий документ «Глобальная инициатива по астме»)
HLA	– human leucocyte antigen (главный комплекс гистосовместимости)
IL	– интерлейкин
IFN	– интерферон
O.f.	– <i>Opisthorchis felinus</i>
PE	– фикоэритрин
T-reg	– T-regulatory cells (регуляторные Т-клетки)
TGF	– transforming growth factor (трансформирующий фактор роста)
Th 1	– Т-хелпер 1 типа
Th 2	– Т-хелпер 2 типа
7-AAD	– 7-амино-актиномицин D

Подписано в печать 21.03.2012г.  
Усл. печ. листов 065 Печать на ризографе.  
Отпечатано в лаборатории оперативной полиграфии СибГМУ  
634050, г.Томск, Московский тракт, 2, тел. 53-04-08  
Заказ № 78 Тираж 100 экземпляров