

**Федеральное государственное учреждение науки  
«Московский научно-исследовательский институт  
эпидемиологии и микробиологии им.Г.Н.Габричевского»  
Федеральной службы по надзору в сфере  
защиты прав потребителей и благополучия человека  
(ФГУН МНИИЭМ им.Г.Н.Габричевского  
Роспотребнадзора)**



На правах рукописи

**БАБАЕВ АЛЕКСЕЙ АЛЕКСАНДРОВИЧ**

**РАСТВОРИМЫЕ КОМПЛЕКСЫ АНТИГЕНОВ АДГЕЗИИ  
В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА**

**14.00.36 – аллергология и иммунология**

**Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук**

**Нижний Новгород****2006**

Работа выполнена в Государственном образовательном учреждении Высшего профессионального образования «Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского» и Федеральном государственном учреждении науки «Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. акад. И.Н. Блохиной» Роспотребнадзора

**Научный руководитель:**

доктор биологических наук, профессор В.В. Новиков

**Официальные оппоненты:**

Доктор медицинских наук, доцент Евсегнеева Ирина Валентиновна

Доктор биологических наук, профессор Козлов Леонид Васильевич

**Ведущая организация:**

Государственное учреждение Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина РАМН

Защита состоится «\_\_\_»\_\_\_\_\_2006 года в «\_\_\_» часов на заседании диссертационного совета К 208.046.01 при ФГУН «Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора по адресу: 125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, д. 10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГУН «Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора

Автореферат разослан «\_\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2006 года

Ученый секретарь  
Диссертационного Совета,  
кандидат медицинских наук

Л.И. Новикова

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность проблемы

Белки адгезии играют важную роль во многих биологических процессах, таких как эмбриогенез, гемостаз и воспаление. Основная их функция состоит в поддержании межклеточных взаимодействий и взаимодействий между клетками и экстраклеточным матриксом. Подобные контакты обеспечивают передачу сигналов, регулирующих функции структурных компонентов цитоскелета, участвующих в процессе активации клетки. Благодаря своим цитоплазматическим доменам адгезивные молекулы воспринимают внутриклеточные сигналы, которые регулируют экспрессию, распределение по клеточной мембране (спреидинг) и функциональную активность поверхностных рецепторов (Aplin et al., 1998). К антигенам адгезии относят большую группу интегринов, являющихся гетеродимерами. Наиболее важную роль в иммунных реакциях играет семейство  $\beta_2$ -интегринов и иммуноглобулиноподобные белки семейства ICAM. Так, в формировании иммунологического синапса участвуют  $\beta_2$ -интегрин, называемый LFA-1, и белок адгезии ICAM-1 (Bromley et al., 2001). В инициации первичного иммунного ответа принимает участие антиген адгезии ICAM-3, взаимодействующий на дендритных клетках с DC-SIGN, а также с LFA-1 (CD11a/CD18) (van der Vieren et al., 1995; Bleijs et al., 2001).

Многие молекулы адгезии существуют не только в мембранной, но и в растворимой форме. Растворимые антигены адгезии могут находиться как в мономерной, так и в олигомерной форме, они сохраняют способность взаимодействовать со своими мембранными партнерами, принимают участие в регуляции иммунных реакций (Новиков и др., 2006; Jun et al., 2001). Их содержание в биологических жидкостях способно меняться при вирусных гепатитах, ВИЧ-инфекции, ожоговой патологии, аутоиммунных и онкологических заболеваниях (Евсегнеева и др., 2005; Horiike et al., 1994; Blann et al., 2002). Концентрация растворимых молекул адгезии в сыворотке крови может выступать как показатель тяжести течения и прогноза некоторых заболеваний (Лебедев, 2003; Kuang et al., 2002).

### **Цель исследования**

На основе существующих предпосылок изучить возможность наличия в крови человека растворимых комплексов, состоящих из  $\beta_2$ -интегринов и молекул адгезии семейства ICAM, и оценить влияние патологических состояний на их сывороточный уровень.

### **Задачи**

1. Оценить сывороточный уровень растворимого CD50 антигена при вирусных гепатитах А, В, С, ожоговой травме, раке молочной железы.
2. Определить относительное содержание в сыворотке крови суммарной и олигомерной фракций растворимого CD54 антигена при указанных заболеваниях.
3. Разработать иммуноферментный метод детекции растворимой формы CD18 антигена.
4. Определить сывороточный уровень растворимой формы CD18 антигена в крови здоровых доноров и больных вирусными гепатитами, раком молочной железы, ожоговых больных.
5. Разработать иммуноферментные методы детекции растворимых комплексов CD18-CD54 и CD18-CD50 в крови человека и определить их сывороточное содержание у здоровых доноров.
6. Оценить сывороточный уровень растворимых ассоциатов CD18-CD54 и CD18-CD50 при вирусных гепатитах А, В, С, ожоговой травме, раке молочной железы.

### **Научная новизна**

Выявлены изменения сывороточного уровня растворимого CD50 (sCD50) антигена, а также относительного содержания CD50-положительных (CD50<sup>+</sup>) моноклеарных клеток у больных с ожоговой травмой различной площади поверхности тела на протяжении всего периода течения ожоговой болезни.

Показано повышение сывороточного уровня суммарной фракции растворимого CD54 (sCD54) антигена у больных вирусным гепатитом С, не имеющих антител к NS3 или NS4 белкам или имеющих IgM к core-антигену. При вирусных гепатитах А и С, ожоговой болезни обнаружено увеличение сывороточного уровня олигомерной фракции sCD54 антигена.

Продемонстрировано наличие растворимой формы CD18 (sCD18) антигена в крови человека. Сывороточный уровень sCD18 антигена увеличивался при вирусном гепатите А, снижался при раке молочной железы. Выявлены изменения в сывороточном уровне sCD18 антигена, а также в относительном содержании CD18-положительных (CD18<sup>+</sup>) мононуклеарных клеток периферической крови, сохранявшиеся на протяжении всего периода ожоговой болезни.

В крови человека впервые обнаружены растворимые ассоциаты антигенов CD18 и CD54, а также антигенов CD18 и CD50. Определена их сывороточная концентрация в крови здоровых доноров. У больных вирусным гепатитом В с высоким титром HBs-антигена наблюдалось снижение уровня растворимых комплексов CD18-CD54, а с более низким титром HBs-антигена – повышение сывороточного содержания растворимых комплексов CD18-CD50. Показано, что концентрация комплексов CD18-CD54 возросла в крови больных вирусным гепатитом С, не имеющих антител к NS3 или NS5 антигенам. У больных гепатитом С, в крови которых были выявлены IgM к core-белку, повышался сывороточный уровень растворимых комплексов CD18-CD54 и CD18-CD50. При раке молочной железы содержание растворимых комплексов CD18-CD54 снижалось.

### **Практическая значимость работы**

С использованием моноклональных и поликлональных антител разработаны иммуноферментные методы определения растворимого антигена CD18, а также растворимых комплексов CD18-CD54 и CD18-CD50 в сыворотке крови. Методы применимы при изучении участия этих белков в молекулярных механизмах иммунных реакций. Результаты могут быть использованы для оценки состояния иммунитета, являться основой для разработки современных методов мониторинга иммуноопосредованных заболеваний, создания новых подходов к оценке эффективности вакцинопрофилактики социально значимых инфекций. Данные включены в программу курса по иммунологии для студентов ВУЗов медицинского и биологического профиля.

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

1. В крови человека присутствуют растворимая форма CD18 антигена и растворимые комплексы CD18-CD54 и CD18-CD50.

2. Сывороточный уровень олигомерного sCD54 антигена увеличивается при вирусных гепатитах А и С; концентрация sCD18 антигена повышается при гепатите А и снижается при раке молочной железы. Содержание растворимых ассоциатов CD18-CD54 увеличивается при гепатите С и снижается при раке молочной железы.

3. Выявлены изменения сывороточного содержания sCD18, sCD50 антигенов, а также относительного количества CD18<sup>+</sup> и CD50<sup>+</sup> мононуклеарных клеток крови при ожоговой болезни.

### **Апробация работы**

Апробация диссертации состоялась 14 сентября 2006 года на расширенном совместном заседании кафедры молекулярной биологии и иммунологии Нижегородского госуниверситета им. Н.И. Лобачевского и Нижегородского отделения Российского научного общества иммунологов с участием сотрудников НИИ эпидемиологии и микробиологии им. акад. И.Н. Блохиной.

Результаты работы представлены на Международном конгрессе молодых ученых «Науки о человеке» (Томск, 2003), VIII, IX и XI Нижегородских сессиях молодых ученых (Нижний Новгород, 2003, 2004, 2006), 8-й Международной Пущинской школе-конференции молодых ученых (Пущино, 2004), научной конференции с международным участием «Современные средства иммунодиагностики, иммуно- и экстренной профилактики актуальных инфекций» (Санкт-Петербург, 2004), II Всероссийском симпозиуме «Тест-методы химического анализа» (Саратов, 2004), научной конференции «Новые технологии в профилактике, диагностике, эпиднадзоре и лечении инфекционных заболеваний», посвященной 85-летию со дня рождения академика РАМН И.Н. Блохиной (Нижний Новгород, 2006).

### **Публикации**

По теме диссертации опубликовано 13 печатных работ.

### **Структура и объем диссертации**

Диссертационная работа в объеме 162 листов состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследований, собственных результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Диссертация иллюстрирована 42 рисунками и 9 таблицами. Библиографический указатель включает 203 источника литературы (35 отечественных и 168 иностранных).

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Материалы и методы исследования

Материалом для исследования содержания растворимых форм мембранных антигенов служили 65 образцов сыворотки крови больных гепатитом А, 65 образцов сыворотки крови больных острым гепатитом В и 70 образцов сыворотки крови больных острым гепатитом С, находившихся на лечении в Нижегородской городской инфекционной больнице № 2. Также было проанализировано 60 образцов сыворотки крови больных раком молочной железы II–III стадии, проходивших лечение в Нижегородской областной клинической больнице им. Н.А. Семашко. В работе также использовано 237 образцов сыворотки крови пациентов с ожоговой травмой различной степени тяжести, проходивших лечение в Российском ожоговом центре на базе Нижегородского НИИ травматологии и ортопедии. Все диагнозы были поставлены и верифицированы врачебными коллективами соответствующих учреждений.

В качестве контроля использовали образцы сыворотки крови 320 доноров, не содержащие антител к вирусу гепатита С, HBs антиген, антител класса М к цитомегаловирусу и антител классов G и М к возбудителю сифилиса, предоставленные Нижегородской областной станцией переливания крови.

Определение уровня растворимых форм мембранных антигенов проводили двухсайтовым иммуноферментным методом с использованием моноклональных антител (МКА) серии ИКО и поликлональных антител, специфичных к мембранным антигенам мононуклеарных клеток крови человека. Сывороточный уровень растворимых антигенов CD50, CD54, CD18 определяли с применением меченых пероксидазой хрена МКА ИКО-60, ИКО-184, ИКО-108, соответственно, и поликлональных антител против мононуклеарных клеток периферической крови человека, используемых в качестве «первых» антител и сорбируемых в лунки планшетов для иммуноферментного анализа. Для исследования уровня олигомерной фракции растворимого CD54 антигена в качестве первых антител использовали очищенные МКА ИКО-184, в качестве вторых антител применяли МКА ИКО-184, меченные пероксидазой хрена.

Имунофенотипирование мононуклеарных клеток периферической крови проводили методом непрямой иммунофлуоресценции с помощью МКА серии

ИКО. Использовали МКА, полученные в Российском онкологическом научном центре им. Н.Н. Блохина РАМН.

Маркеры вирусных гепатитов определяли с помощью иммуноферментных тест-систем фирмы «Диагностические системы» (г. Нижний Новгород).

Статистический анализ проводили с использованием критериев Манна-Уитни, Стьюдента и критерия ранговой корреляции Спирмена.

### **Результаты и их обсуждение**

В реализации иммунного ответа существенное значение имеют антигены адгезии, обеспечивающие взаимодействия клеток, удерживающие клетки при реализации эффекторных механизмов, принимающие участие в формировании иммунного синапса. Одним из результатов взаимодействия клеток служит появление в крови растворимых антигенов адгезии, образующихся путем протеолитического шеддинга (Новиков и др., 2006).

Предпосылкой к выполнению настоящей работы явилось предположение, что в результате шеддинга молекул адгезии могут образовываться не только растворимые антигены, присутствующие в крови в виде отдельных белковых молекул, но и растворимые комплексы, состоящие из взаимодействующих белков, срезанных с поверхности контактирующих клеток.

Белки, входящие в состав растворимых ассоциатов, лишены способности обеспечивать модулирующие эффекты, свойственные свободным растворимым формам мембранных антигенов. Их центры связывания взаимно блокированы, что приводит к изменению общего иммуномодулирующего потенциала пула растворимых антигенов. В связи с этим эффекторные свойства растворимых форм мембранных антигенов могут непосредственно зависеть от того, находятся они в свободной или связанной форме, то есть в составе растворимого комплекса.

В качестве объектов исследования были выбраны растворимые антигены адгезии – представители суперсемейств иммуноглобулинов – CD50 (ICAM-3), CD54 (ICAM-1) и суперсемейства интегринов (CD18). Их мембранные формы участвуют в формировании иммунологического синапса и тем самым обеспечивают одно из центральных событий иммунного ответа – презентацию антигена. Мы оценили сывороточные уровни растворимых форм этих антигенов при заболеваниях различного генеза – инфекционных (вирусные

гепатиты А, В, С), неопластических (рак молочной железы) и травматологических (ожоговая травма).

Сывороточное содержание sCD50 антигена в крови больных вирусным гепатитом А было повышено в 3,7 раза в сравнении с нормой ( $p < 0,05$ ) (рис. 1). Высокий сывороточный уровень sCD50 антигена у больных вирусным гепатитом А наряду с выявленным ранее высоким содержанием растворимых молекул HLA I класса (Евсегнеева и др., 2005) отражает активное привлечение клеточного звена иммунитета для защиты организма.

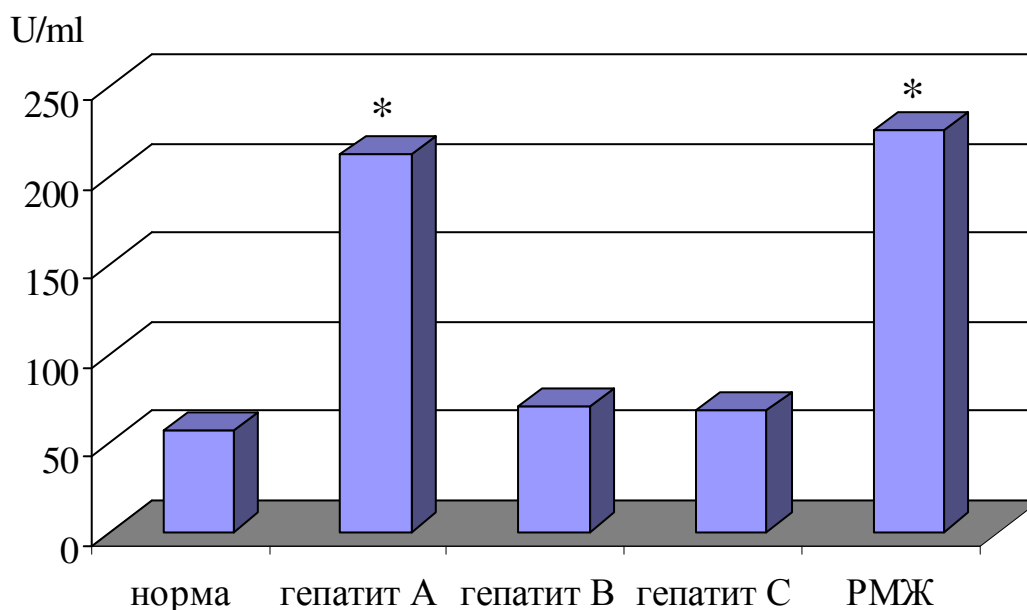


Рис. 1. Сывороточное содержание sCD50 антигена при иммуноопосредованных заболеваниях

\* – достоверные отличия в сравнении с нормой ( $p < 0,05$ )

При остром гепатите В была выявлена тенденция к увеличению сывороточного уровня растворимой молекулы CD50 ( $p > 0,05$ ). Сывороточное содержание sCD50 антигена в крови больных острым гепатитом С также имело тенденцию к повышению ( $p > 0,05$ ) (рис. 1). Сходные результаты были получены ранее другими авторами (Птицына и др., 2000; Евсегнеева и др., 2005).

У больных с первично выявленным раком молочной железы II–III стадии содержание sCD50 антигена было повышено в среднем в 4 раза ( $p < 0,05$ ) (рис. 1). Увеличение сывороточного содержания sCD50 антигена при раке молочной железы было также отмечено А.В. Алясовой и др. (2004), что авторы связывают

с повышенным шеддингом мембранной формы CD50 антигена с мононуклеарных клеток периферической крови.

В связи с тем, что в доступной литературе мы не обнаружили информации о сывороточном содержании sCD50 антигена при ожогах, нами проведено детальное исследование уровня этого антигена на разных стадиях ожоговой болезни. При ожогах площадью менее 30% поверхности тела в течение первой недели после травмы наблюдалось повышенное содержание растворимой формы молекулы CD50 ( $p < 0,05$ ) (рис. 2). На второй неделе со дня получения термической травмы регистрировалось снижение сывороточного уровня sCD50 антигена до нормы, которое сохранялось и в дальнейшем.

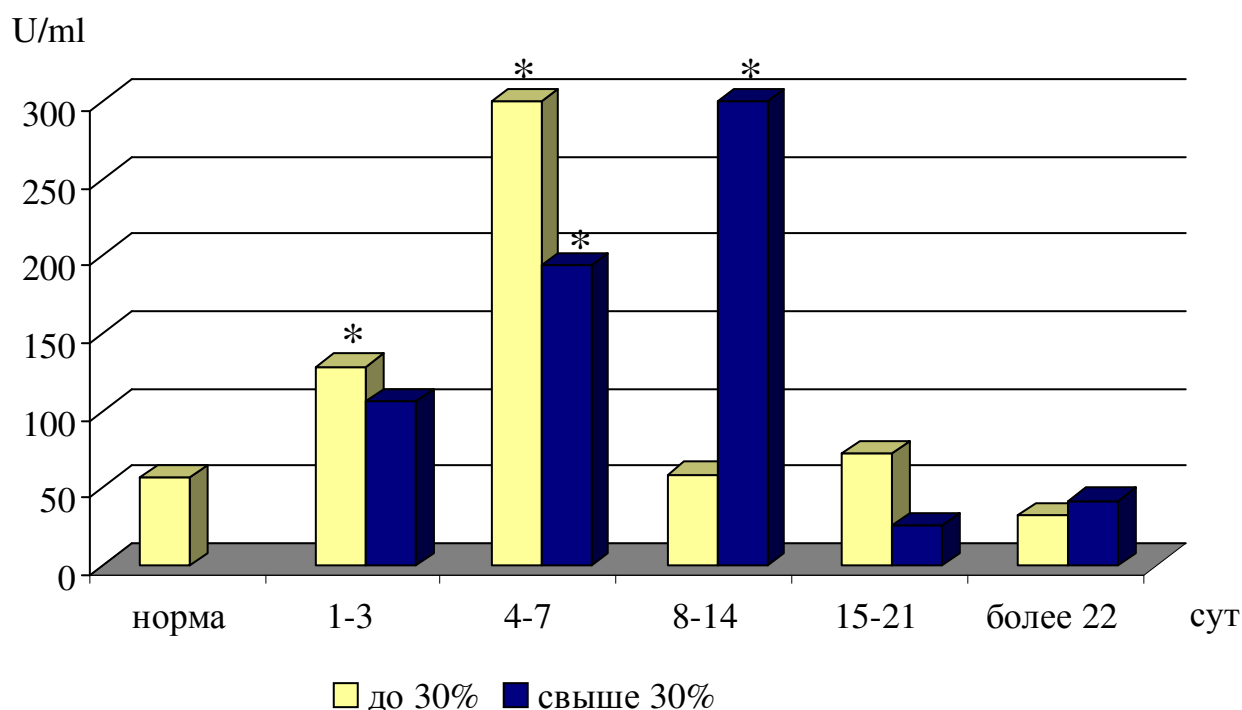


Рис. 2. Сывороточное содержание sCD50 антигена при ожогах

\* – достоверные отличия в сравнении с нормой ( $p < 0,05$ )

При ожогах площадью свыше 30% поверхности тела в первые трое суток после получения ожога изменений в уровне растворимого CD50 антигена по сравнению с нормой не отмечалось. С 4 по 14 сутки с момента травмы содержание sCD50 антигена повышалось по сравнению с нормой ( $p < 0,05$ ). В последующие периоды (от 15 суток и более) происходила нормализация сывороточного содержания sCD50 антигена.

При ожогах с площадью поражения менее 30% поверхности тела на фоне повышения уровня sCD50 антигена происходило снижение относительного количества CD50<sup>+</sup> клеток. Такая же картина наблюдалась при ожогах с поражением кожных покровов более 30%, однако снижение относительного количества CD50<sup>+</sup> моноклеарных клеток происходило только со второй недели с момента травмы. Повышение уровня растворимых молекул адгезии в крови ожоговых больных вероятно снижает способность активированных CD50<sup>+</sup> клеток проникать в очаг воспаления, а также приводит к нарушению клеточных контактов наивных Т-лимфоцитов с антигенпрезентирующими клетками.

На наш взгляд снижение относительного количества CD50<sup>+</sup> лимфоцитов и повышение сывороточного уровня sCD50 антигена может являться возможным фактором формирования послеожоговых иммунодефицитных состояний. Последние, по данным М.Ю. Lebedev et al. (2001) проявляются стойким сокращением популяции CD4<sup>+</sup>-клеток, выполняющих функцию Т-хелперов.

Растворимые формы CD54 антигена могут существовать как в виде отдельных белковых молекул, так и в виде димерных и олигомерных форм и нести важную информацию о состоянии системы иммунитета (Егорова и др., 2004; Jun et al., 2001). При вирусном гепатите А наблюдалась выраженная тенденция к повышению сывороточного уровня суммарного sCD54 антигена ( $p > 0,05$ ). Сывороточное содержание олигомерной фракции sCD54 антигена увеличивалось в 2,9 раза ( $p < 0,05$ ) (рис. 3). Более выраженное увеличение содержания олигомерного sCD54 антигена в сравнении с изменениями уровня суммарного sCD54 антигена, с нашей точки зрения, отражает напряженность иммунологических реакций, направленных на элиминацию вируса гепатита А. При формировании иммунного синапса, образующегося при непосредственном участии CD54 антигена, происходит кластеризация мембранных белков, отвечающих за взаимодействие иммунокомпетентных клеток (Bromley et al., 2001). Последующее расхождение клеток может сопровождаться шеддингом кластеризованных белков и выходом их в межклеточное пространство.

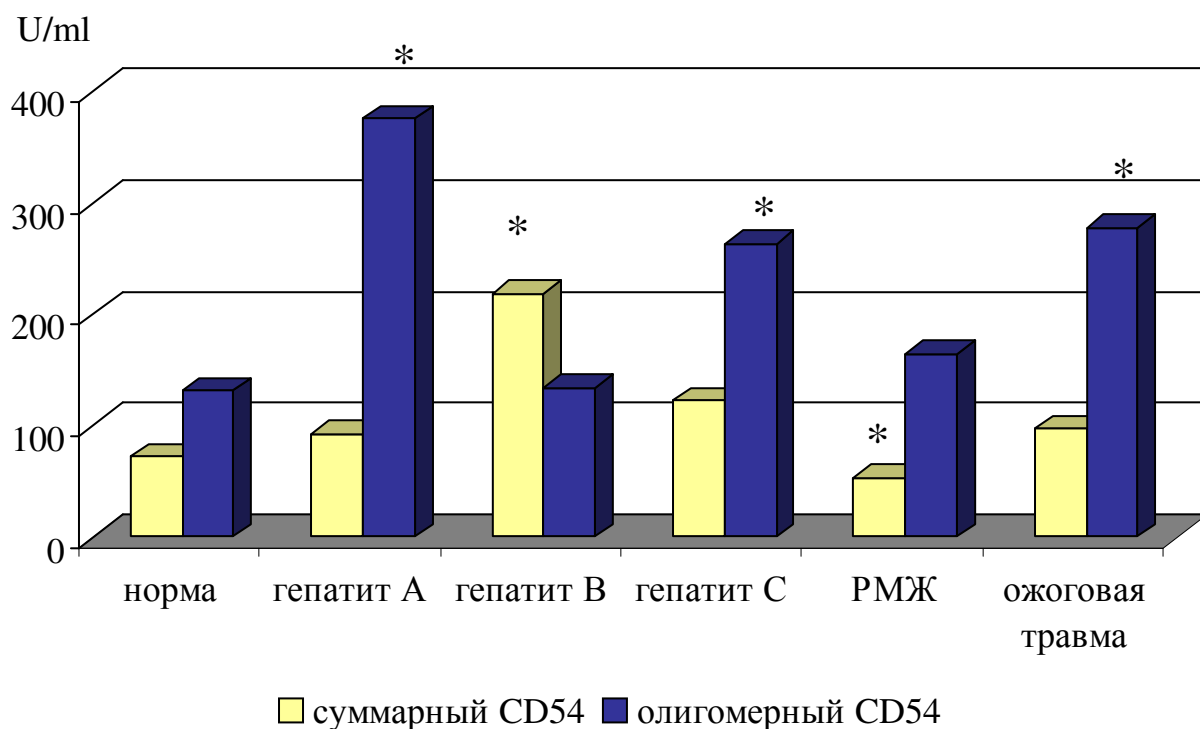


Рис. 3. Сывороточное содержание растворимых фракций (суммарного и олигомерного) CD54 антигена при разных патологиях

\* – достоверные отличия в сравнении с нормой ( $p < 0,05$ )

При вирусном гепатите В сывороточный уровень суммарной фракции sCD54 антигена в 3 раза превышал нормальные значения ( $p < 0,05$ ). Содержание олигомерного sCD54 антигена не менялось (рис. 3). Повышение сывороточного уровня суммарной фракции растворимых молекул CD54 антигена, зарегистрированное ранее другими авторами, принято связывать с возникающей вследствие вирусного поражения печени экспрессией этих молекул на гепатоцитах (Zhang et al., 2000).

У больных вирусным гепатитом С содержание суммарного sCD54 антигена достоверно не изменялось, однако наблюдалась выраженная тенденция к повышению. Повышение сывороточного содержания sCD54 антигена при гепатите С отмечено в работах G. Zohrens et al. (1993), S.S. Yang et al. (1996). Уровень олигомерного sCD54 антигена увеличивался в 2 раза выше нормальных показателей ( $p < 0,05$ ) (рис. 3). У больных гепатитом С, не имеющих в крови антител против неструктурных белков NS3 или NS4, выявлено повышение

сывороточного уровня sCD54 антигена по сравнению с группой здоровых доноров.

Содержание суммарного sCD54 антигена в сыворотке больных раком молочной железы было в 1,4 раза меньше нормы ( $p < 0,05$ ). Уровень олигомерного sCD54 антигена не изменялся (рис. 3).

При ожоговой травме сывороточный уровень суммарной фракции sCD54 антигена имел тенденцию к повышению ( $p > 0,05$ ), что соответствует литературным данным (Ahmed et al., 1998; Kuang et al., 2002). Содержание олигомерного CD54 антигена определено при ожоговой травме впервые. При ожогах площадью более 30% поверхности тела уровень олигомерного sCD54 антигена увеличен в 2,1 раза ( $p < 0,05$ ) (рис. 3). Полученные данные свидетельствуют, что при тяжелой ожоговой травме в суммарной фракции sCD54 антигена возрастает доля олигомерных молекул CD54.

Если для белков группы ICAM (CD50, CD54) продемонстрировано наличие растворимых форм, то для их партнеров по межклеточным взаимодействиям –  $\beta_2$ -интегринов – на момент начала данного исследования подобной информации в доступной нам литературе не найдено. Мы предположили, что  $\beta_2$ -интегрины также могут переходить в растворимую форму. С целью проверки высказанной гипотезы был разработан иммуноферментный метод определения в биологических жидкостях sCD18 антигена (субъединицы, общей для всех  $\beta_2$ -интегринов), основанный на использовании моноклональных антител к CD18 антигену. Его специфичность подтверждена в реакции нейтрализации.

Разработанный иммуноферментный метод был апробирован для определения содержания sCD18 антигена в крови здоровых доноров. Сывороточный уровень sCD18 антигена у доноров составил в среднем  $212,3 \pm 32,0$  U/ml. Совместно с Н.И. Егоровой определен уровень растворимого CD18 антигена в сыворотке крови больных урогенитальным хламидиозом. Показано, что при урогенитальном хламидиозе сывороточная концентрация sCD18 антигена повышалась в 2,0 раза.

Сывороточный уровень sCD18 антигена у больных гепатитом А в 10 раз превышал нормальные значения ( $p < 0,05$ ) (рис. 4). В отличие от гепатита А, при вирусном гепатите В значительного изменения в содержании sCD18 антигена не происходило. Следует отметить, что при этом сывороточный уровень sCD54 антигена увеличивался в несколько раз. Изменение сывороточной

концентрации sCD54 антигена при нормальном содержании sCD18 антигена свидетельствует о нарушении баланса в содержании растворимых форм данных молекул адгезии при вирусном гепатите В. Растворимые антигены группы ICAM могут блокировать мембранные CD18-содержащие интегрины и тем самым ограничивать аутоиммунные реакции, развивающиеся при гепатите В.

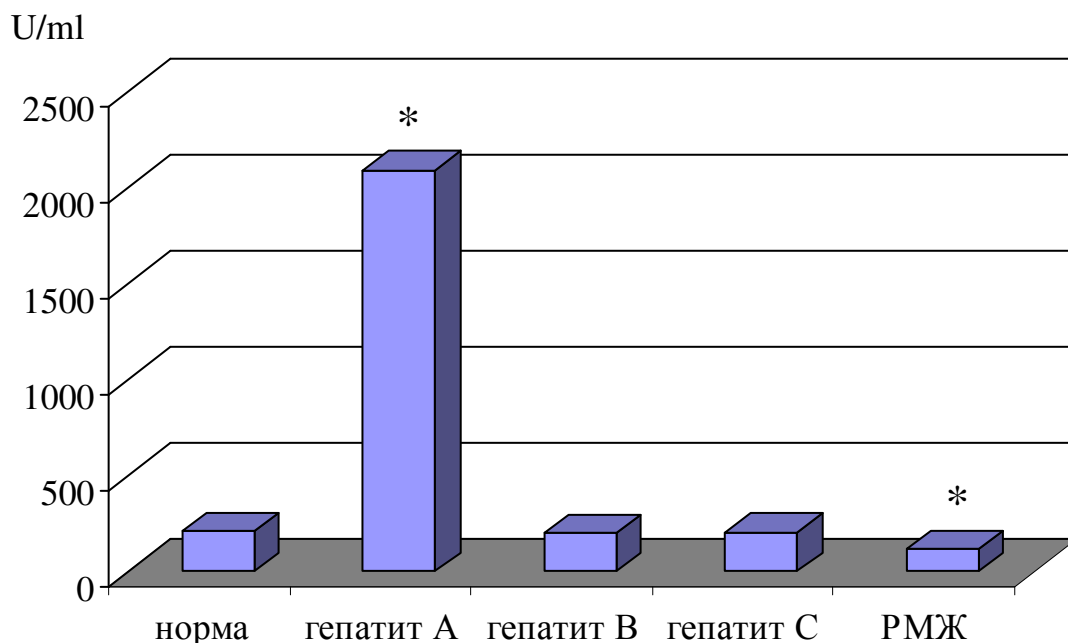


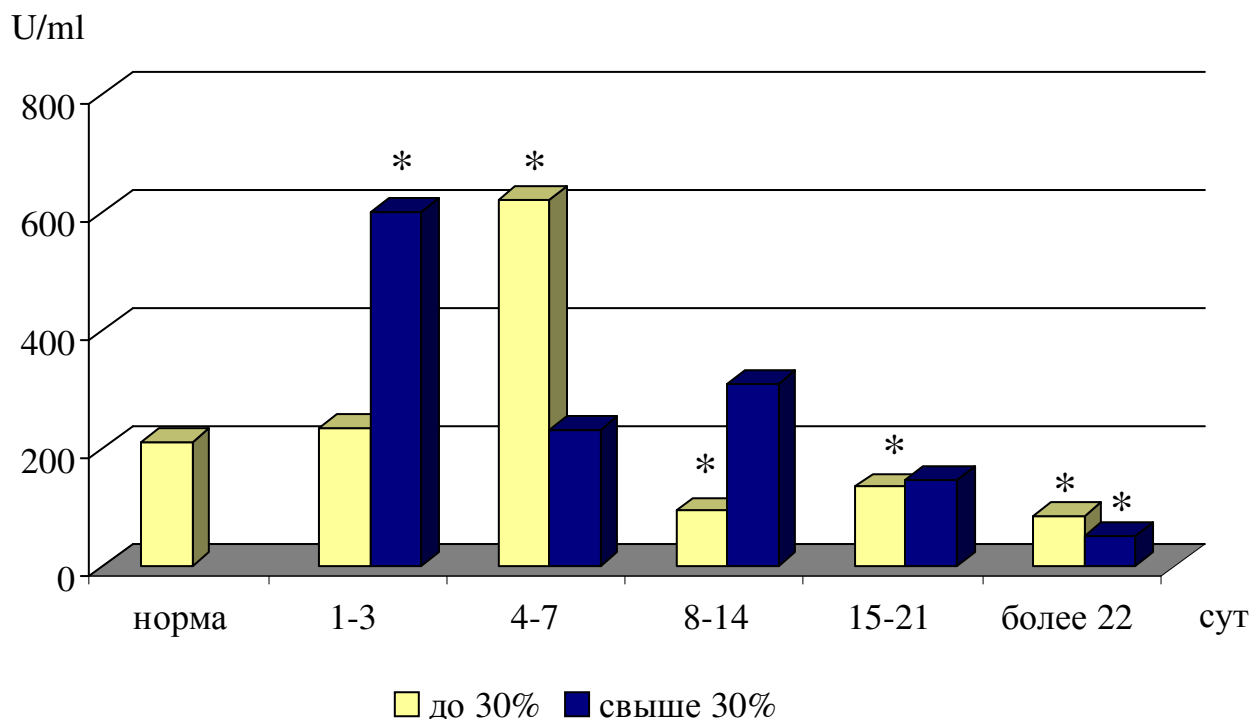
Рис. 4. Сывороточное содержание sCD18 антигена при разных патологиях

\* – достоверные отличия в сравнении с нормой ( $p < 0,05$ )

В сыворотке крови больных вирусным гепатитом С статистически значимых изменений в содержании sCD18 антигена, как и sCD54 антигена не обнаружено. Тем не менее, выявлены различия между уровнем sCD18 антигена у больных, имеющих и не имеющих антител к NS3 белку вируса гепатита С. У больных, положительных по антителам против NS3 антигена, сывороточный уровень sCD18 антигена был в 1,3 раза ниже, чем у больных, не имеющих этих антител ( $p < 0,05$ ).

При раке молочной железы сывороточный уровень sCD18 антигена был в 1,8 раза меньше по сравнению с таковым у здоровых доноров ( $p < 0,05$ ), что, возможно, связано с формированием у онкологических больных иммунологической недостаточности (рис. 4).

Сывороточный уровень sCD18 антигена при ожоговой болезни менялся в зависимости от времени, прошедшего с момента травмы. При ожогах с площадью поражения поверхности тела до 30% отмечено трехкратное повышение сывороточного уровня sCD18 антигена в период с 4 по 7 сутки после травмы ( $p < 0,05$ ). Далее наблюдалось падение его сывороточной концентрации по сравнению с нормой и предшествующим периодом болезни



( $p < 0,05$ ) (рис. 5).

Рис. 5. Сывороточное содержание sCD18 антигена при ожогах

\* – достоверные отличия в сравнении с нормой ( $p < 0,05$ )

При ожогах площадью свыше 30% поверхности кожи уже в первые сутки после травмы регистрировалось более чем двукратное повышение сывороточного уровня sCD18 антигена по сравнению с нормальными показателями ( $p < 0,05$ ). Последующие периоды ожоговой болезни характеризовались нормальным содержанием растворимой адгезивной молекулы CD18. И лишь в период реконвалесценции происходило снижение сывороточного уровня sCD18 антигена в 4 раза по сравнению со здоровыми донорами ( $p < 0,05$ ) (рис. 5).

Сравнение относительного количества CD18<sup>+</sup> мононуклеарных клеток и сывороточного уровня sCD18 антигена при ожогах площадью свыше 30%

поверхности тела позволило выявить прямо противоположную динамику этих показателей. Можно предположить, что именно моноклеарные клетки являются основным источником sCD18 антигена в крови у тяжелообожженных больных. При ожогах площадью менее 30% подобных изменений не обнаружено. Вероятно, в формировании пула sCD18 антигена участвуют не только лимфоциты, но и макрофагальные клетки. Показано, кроме того, что при ожоговой травме происходит активация нейтрофилов, которая проявляется, в том числе, повышением их адгезивной способности (Fang et al., 1998).

Таким образом, получены данные о наличии растворимой формы CD18 антигена в сыворотке крови здоровых доноров и показаны изменения его уровня при заболеваниях различного генеза. Одновременное определение растворимых форм молекул адгезии, являющихся партнерами друг друга, – белков группы ICAM и CD18 антигена – позволило глубже оценить адгезивную составляющую иммунологического статуса больных с данными патологиями.

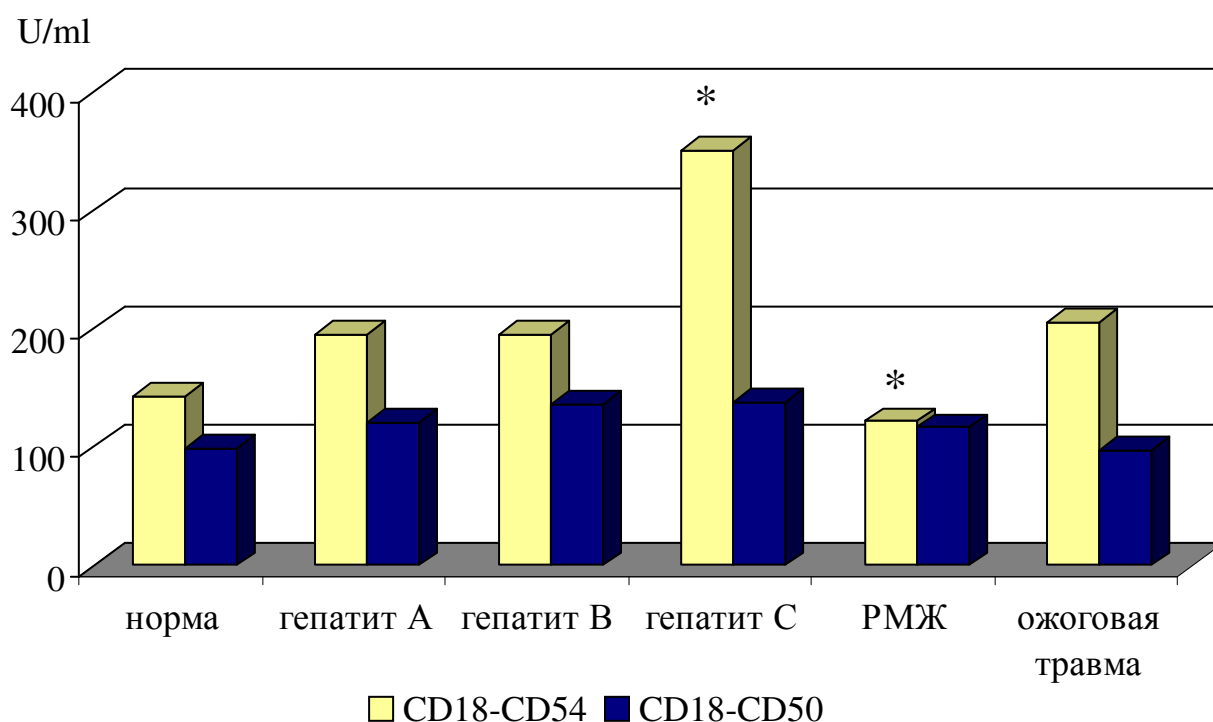
С целью оценки возможности наличия в крови человека растворимых комплексов белков адгезии, участвующих в формировании иммунного синапса, – ассоциатов антигенов CD18 и CD54, а также антигенов CD18 и CD50 были разработаны соответствующие иммуноферментные методы. Для определения ассоциатов CD18-CD54 в качестве первых антител, сорбируемых на твердую фазу, использовали МКА ИКО-108 против CD18 антигена; в качестве иммуноферментного конъюгата применяли МКА ИКО-184 против CD54 антигена, связанные с пероксидазой хрена. Для детекции ассоциата CD18-CD50 в качестве первых антител, сорбируемых на твердую фазу, вносили МКА ИКО-60 против CD50 антигена; в качестве иммуноферментного конъюгата использовали МКА ИКО-108 против CD18 антигена. Специфичность разработанных методов была подтверждена в реакции нейтрализации с использованием МКА против тестируемого антигена и МКА ИКО-160 против CD95 антигена.

С помощью разработанных методов тестирования растворимых ассоциатов молекул адгезии удалось выявить наличие растворимых комплексов белков группы ICAM и CD18 антигена в сыворотке крови здоровых доноров. Мы полагаем, что в состав этих комплексов входят не одиночные  $\beta$ -цепи CD18-содержащих интегринов, а гетеродимеры полностью, например, LFA-1, существование которого было обнаружено в 2006 году (Evans et al., 2006). В

соответствии с нашими данными гетеродимер LFA-1 присутствует в крови не только в свободной растворимой форме, но и может находиться в составе ассоциатов с белками ICAM.

Разработанные иммуноферментные методы позволили также определить относительное содержание растворимых комплексов антигена sCD18 с sCD54 антигеном или sCD50 антигеном при заболеваниях различной этиологии. Проведен сравнительный анализ относительного содержания обнаруженных белковых комплексов с уровнями отдельных растворимых молекул, участвующих в их формировании.

Сывороточный уровень растворимых комплексов молекул адгезии в крови больных острым гепатитом А не изменялся по сравнению с нормой (рис. 6). При этом наблюдалось увеличение сывороточных уровней суммарных фракций молекул адгезии (рис. 1, 3, 4), что, вероятно, отражает активацию внеклеточного протеолиза мембранных белков при гепатите А. Однако, подобная интенсификация протеолитических примембранных процессов не приводит к повышению концентрации ассоциатов, построенных из растворимых белков адгезии. То есть увеличение содержания отдельных растворимых белков адгезии происходит за счет свободных, не связанных с лигандами молекул, способных взаимодействовать с мембранными партнерами и оказывать



иммуномодулирующий эффект.

Рис. 6. Сывороточное содержание растворимых комплексов CD18-CD54 и CD18-CD50 при различных патологиях

\* – достоверные отличия в сравнении с нормой ( $p < 0,05$ )

При гепатите В наблюдалась тенденция к увеличению концентрации растворимых ассоциатов с участием растворимых молекул CD18 и CD50 ( $p < 0,05$ ). Сывороточное содержание растворимых форм молекул адгезии, участвующих в формировании этих комплексов, было неизменным. Выявлена взаимосвязь между сывороточными уровнями растворимых комплексов CD18-CD54 и олигомерного sCD54 антигена при остром гепатите В ( $r = 0,7$ ;  $p < 0,05$ ), при этом корреляций с суммарной фракцией sCD54 антигена обнаружено не было. Можно предположить, что при данном заболевании в составе растворимых ассоциатов CD18-CD54 находятся не одиночные молекулы sCD54 антигена, а олигомерные конгломераты.

Проведено исследование сывороточных уровней растворимых ассоциатов молекул адгезии при наличии или отсутствии в крови маркеров вирусного гепатита В. У больных с титром HBs-антигена более 1:128, не имевших антител класса G к HBe-антигену или антител класса M к HBc-антигену, отмечено пониженное содержание растворимых комплексов CD18-CD54 в крови ( $p < 0,05$ ). В сыворотке крови пациентов с титром HBs-антигена менее 1:128 или больных, имеющих антитела класса M к HBc-антигену, выявлено повышение уровня ассоциатов CD18-CD50 ( $p < 0,05$ ). В сыворотке крови больных острым гепатитом В анти-HBc класса M появляются на начальной стадии заболевания, что свидетельствует о развитии активного инфекционного процесса (Соринсон, 1998). Повышенное содержание растворимых комплексов CD18-CD50 в крови больных с анти-HBc класса M можно интерпретировать как один из показателей ранней активации процессов взаимодействия клеток иммунной системы.

Содержание растворимых комплексов CD18-CD50 в крови больных вирусным гепатитом С оставалось неизменным. Сывороточный уровень растворимых ассоциатов CD18-CD54 увеличивался по сравнению с нормой в 2,5 раза ( $p < 0,05$ ) (рис. 6). При этом относительное содержание тестируемых в настоящем исследовании растворимых форм белков адгезии возрастало в разной степени. Обращает на себя внимание тот факт, что наиболее выраженное повышение было зарегистрировано для олигомерной формы sCD54 антигена

(рис. 3) и ассоциатов sCD54 антигена с sCD18 антигеном (рис. 6). Корреляционный анализ позволил выявить наличие достоверной положительной связи между уровнем олигомерной формы sCD54 антигена и относительной концентрацией растворимых комплексов CD18-CD54 ( $r=0,6$ ;  $p<0,05$ ). Наличие такой корреляции указывает на высокую вероятность присутствия олигомерных форм sCD54 антигена в составе комплексов CD54-CD18. Повышение сывороточного уровня растворимых молекул CD54 антигена вероятно связано с возникающей вследствие вирусного поражения печени экспрессией этих молекул на гепатоцитах (Zhang et al., 2000). В результате гепатоциты начинают выступать в роли антигенпрезентирующих клеток и формируют межклеточные контакты, в том числе в виде иммунных синапсов. Разрушение синапсов и shedding белков, принимающих участие в межклеточных взаимодействиях, приводит к повышению уровня растворимых форм молекул адгезии.

Показано, что сывороточное содержание растворимых комплексов CD18-CD54 увеличено в крови больных вирусным гепатитом С, не имеющих антител к NS3 или NS5 антигенам ( $p<0,05$ ). У больных, в крови которых были выявлены антитела класса М к core-белку, возрастал сывороточный уровень как растворимых комплексов CD18-CD54, так и CD18-CD50 ( $p<0,05$ ).

Сывороточное содержание CD18-CD54 комплексов в крови больных раком молочной железы было меньше нормальных значений в 1,2 раза ( $p<0,05$ ) (рис. 6). Также снижались уровни отдельных молекул адгезии, входящих в состав этих комплексов, sCD18 и sCD54 антигенов. Уровни ассоциатов CD18-CD50 в сыворотке крови раковых больных и здоровых доноров не имели достоверных различий. При этом содержание sCD50 антигена увеличивалось по сравнению с нормой. Представленные изменения в сывороточном содержании тестированных антигенов и их ассоциатов, вероятно, являются следствием разбалансированности определенных звеньев иммунного ответа, возникающей на фоне иммунологической супрессии при неопластическом процессе.

Определен сывороточный уровень растворимых ассоциатов адгезивных молекул в крови ожоговых пациентов с площадью поражения кожного покрова более 30% в первые сутки с момента травмы. Обнаружена тенденция к повышению сывороточного содержания растворимых комплексов CD18-CD54 ( $p>0,05$ ) (рис. 6). При этом сывороточный уровень растворимых форм

суммарного и олигомерного CD54 антигена, а также уровень sCD18 антигена увеличивался в сравнении с нормой. Сывороточное содержание растворимых комплексов CD18-CD50 при ожоговой травме не изменялось.

Выявленное у ожоговых больных повышение сывороточного уровня отдельных антигенов на фоне неизменности в содержании комплексов с их участием, вероятно, является результатом неспецифической активации клеток, которая происходит за счет резкого выброса в кровотоки большого количества медиаторов, цитокинов, часто оказывающих разнонаправленное действие. Активация клеток инициирует усиление шеддинга мембранных молекул различными протеолитическими ферментами. Вследствие этого в крови ожоговых пациентов в первые сутки после травмы регистрируются повышенные уровни растворимых форм мембранных антигенов, и в том числе антигенов адгезии, что, в свою очередь, может приводить к нарушениям формирования полноценных контактов между иммунокомпетентными клетками, презентации антигена с участием адгезивных молекул и к снижению вероятности поступления в клетки дополнительных активационных сигналов. По-видимому, это приводит к неизменности сывороточных концентраций растворимых комплексов молекул адгезии. Таким образом, наши данные дополняют концепцию о наличии механизмов ограничения в первые сутки после ожоговой травмы, направленных на предотвращение гиперактивации иммунных процессов.

## **ВЫВОДЫ**

1. Выявлено наличие растворимых комплексов CD18-CD54 и CD18-CD50 в крови человека и определена их сывороточная концентрация у здоровых доноров.

2. Установлено, что сывороточное содержание растворимых ассоциатов CD18-CD54 увеличивается при вирусном гепатите С и снижается у больных гепатитом В, не имеющих антител к HBe или HBs антигенам, но имеющих титр HBs-антигена более 1:128, а также при раке молочной железы. Относительная концентрация в крови растворимых комплексов CD18-CD50 увеличивалась у больных гепатитом В с низким титром HBs-антигена или с наличием антител к

HBs антигену, а также у больных вирусным гепатитом С, имеющих антитела к core-антигену.

3. Показано, что сывороточный уровень растворимого CD50 антигена увеличивается при вирусном гепатите А, раке молочной железы, а также в первые две недели ожоговой болезни.

4. Выявлено увеличение относительного содержания в сыворотке крови растворимого суммарного CD54 антигена при вирусном гепатите В, у больных гепатитом С, не имеющих антител к NS3 или NS4 белкам, но имеющих антитела к core-антигену, и уменьшение – при раке молочной железы. Концентрация растворимого олигомерного CD54 антигена увеличивалась при вирусных гепатитах А, С и ожоговой болезни.

5. Показано наличие в крови человека растворимой формы CD18 антигена и определена его сывороточная концентрация у здоровых доноров. Сывороточный уровень растворимой формы CD18 антигена увеличивается при вирусном гепатите А, ожоговой травме и снижается при раке молочной железы.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Бабаев А.А.**, Лебедев М.Ю. Содержание растворимой формы CD50 антигена при ожоговой болезни // Тез. докл. междунар. конгресса молодых ученых «Науки о человеке». – Томск, 2003. – С. 53-53.

2. **Бабаев А.А.** Уровень растворимого CD54 антигена в крови пациентов с термической травмой // Мат-лы VIII Нижегородской сессии молодых ученых (Естественнонаучные дисциплины). – Нижний Новгород, 2003. – С. 226-227.

3. Егорова Н.И., Курников Г.Ю., **Бабаев А.А.**, Новиков В.В. Сывороточный уровень растворимых молекул межклеточной адгезии при урогенитальном хламидиозе // Цитокины и воспаление. – 2003. – Т. 2, № 2. – С. 32-36.

4. **Бабаев А.А.** Сывороточный уровень адгезивной молекулы CD18 в крови пациентов с ожоговой травмой // Актуальные проблемы медицины и биологии. – 2004. – Вып. 3 (2). – С. 294-294.

5. **Бабаев А.А.**, Егорова Н.И., Новиков В.В. Метод определения сывороточного содержания растворимой формы CD18 антигена // Тез. докл. II Всероссийского симпозиума «Тест-методы химического анализа». – Саратов, 2004. – С. 54-54.

6. **Бабаев А.А.** Роль растворимых форм молекул адгезии в патогенезе ожоговой болезни // Тез. докл. 8-й Международной Пущинской школы-конференции молодых ученых. – Пущино, 2004. – С. 45-45.

7. **Бабаев А.А.** Дисбаланс сывороточных концентраций молекул адгезии при различных патологиях // Мат-лы IX нижегородской сессии молодых ученых (Естественнонаучные дисциплины). – Нижний Новгород, 2004. – С. 200-202.

8. **Бабаев А.А.**, Лебедев М.Ю., Новиков В.В. Оценка мембранной экспрессии и сывороточного содержания молекул адгезии у ожоговых больных с септическими осложнениями // Тез. докл. научн. конф. с междунар. участ. «Современные средства иммунодиагностики, иммуно- и экстренной профилактики актуальных инфекций». – Санкт-Петербург, 2004. – С. 223–224.

9. **Бабаев А.А.**, Уткин О.В. Относительное содержание клеток, экспрессирующих белок адгезии CD18, у пациентов с термической травмой // Актуальные проблемы медицины и биологии. – 2004. – Т. 4, № 1. – С. 26-27.

10. **Бабаев А.А.**, Ятманова Т.А., Кравченко Г.А., Новиков В.В. Обнаружение растворимых комплексов молекул адгезии в сыворотке крови человека и их уровень у больных острым гепатитом В // Мат-лы науч. конф. «Новые технологии в профилактике, диагностике, эпиднадзоре и лечении инфекционных заболеваний», посв. 85-летию со дня рожд. акад. РАМН И.Н. Блохиной. – Нижний Новгород, 2006. – С. 211-215.

11. **Бабаев А.А.**, Ежова Г.П., Новиков В.В., Лебедев М.Ю. Мембранная и растворимая форма CD50 при ожогах // Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского, сер. Биология. – 2005. – С. 249-254.

12. **Бабаев А.А.**, Ятманова Т.А. Выявление растворимых комплексов CD18-CD54 в сыворотке крови человека // Мат-лы XI Нижегородской сессии

молодых ученых (Естественнонаучные дисциплины). – Н. Новгород, 2006. – С. 211-215.

13. *Бабаев А.А.*, Кравченко Г.А., Ятманова Т.А., Копылова Г.Е., Мартынова Т.Г., Новиков В.В. Растворимые комплексы молекул адгезии в сыворотке крови человека // Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского, сер. Биология. – 2006. – Вып. 1 (11). – С. 128-132.