

ЭКСПРЕССИЯ ПАТТЕРН-РАСПОЗНАЮЩИХ РЕЦЕПТОРОВ (PRR) МОНОЦИТАМИ И НЕЙТРОФИЛАМИ НЕДОНОШЕННЫХ НОВОРОЖДЕННЫХ РАЗЛИЧНЫХ СРОКОВ ГЕСТАЦИИ

Сотникова Н.Ю.¹, Кудряшова А.В.¹, Чаша Т.В.¹, Турова А.В.¹

¹ФГБУ «Ивановский научно-исследовательский институт материнства и детства имени В.Н.Городкова» Минздрава России, Иваново, e-mail: niimid.immune@mail.ru

Недоношенные новорожденные особенно чувствительны к инфекциям, что ведет к значительной заболеваемости и смертности. Врожденный иммунитет является основным фактором защиты организма, а ключевым моментом этого процесса является распознавание патоген ассоциированных молекулярных образов паттерн распознающими рецепторами. В связи с этим мы изучали в крови 77 новорожденных уровень моноцитов и нейтрофилов, экспрессирующих TLR2, TLR4, TLR9, CD11b, CD16 на 1-2 день жизни. Дети были разделены на подгруппы в соответствии с их гестационным возрастом: 11 новорожденных были рождены в 34-37, 38 – в 31-33, 15 - в 29-30 и 13 - в 22-28 недель гестации. Наибольшие изменения во врожденном иммунитете были отмечены у глубоко недоношенных детей (22-28 недель гестации), которые проявлялись снижением экспрессии TLR4, TLR9 моноцитами и TLR2, CD16, что может определять повышенную подверженность инфекциям у глубоко недоношенных детей.

Ключевые слова: недоношенные новорожденные, паттерн распознающие рецепторы

THE EXPRESSION OF PATTERN RECOGNIZING RECEPTORS (PRR) BY MONOCYTES AND NEUTROPHILS OF PRETERM INFANTS OF DIFFERENT GESTATION AGE

Sotnikova N.Yu.¹, Kudryashova A.V.¹, Chasha T.V.¹, Turova A.V.¹

¹Federal State Budget Institute «Ivanovo Research Institute of Maternity and by the name of V.N. Gorodkov» of the Ministry of Health of Russia, Ivanovo, e-mail: niimid.immune@mail.ru

Preterm infants are especially susceptible to infections resulting in substantial morbidity and mortality. The innate immunity is the main factor in host defense and the key moment in this process is the recognition of pathogen associated molecular patterns by pattern recognizing receptors. Therefore we had studied blood level of monocytes and neutrophils, expressing TLR2, TLR4, TLR9, CD11b, CD16 molecules in 77 infants at the 1-2 day of life. The babies were divided according to their gestation age on subgroups: 11 infants were born at 34-37, 38 - at 31-33, 15 - at 29-30 and 13 - at 22-28 weeks of gestation. Newborn innate immunity is the worst in severely preterm babies (22-28 weeks of gestation) demonstrating the diminished expression of TLR4, TLR9 by monocytes and TLR2, CD16 by neutrophils, which can define the enhanced infectious vulnerability in severely preterm babies.

Keywords: preterm infants, pattern recognizing receptors

Понятие недоношенности подразумевает рождение ребенка ранее 37 недель гестации. Частота преждевременных родов во многих странах достигает 11-15% , ежегодно рождается преждевременно 15 миллионов недоношенных новорожденных, при этом преждевременные роды обуславливают до 35 % неонатальной смертности [1]. Выжившие недоношенные младенцы имеют высокую заболеваемость, повышенный риск кровоизлияний в мозг, гормональных и неврологических нарушений, респираторных заболеваний, нарушений зрения [1]. Но самое главное, недоношенные дети крайне чувствительны к инфекции, что является важным фактором, определяющим их высокую смертность и заболеваемость. Иммунная система является основной в поддержании противoinфекционного гомеостаза. Расширение возможностей современной медицины в выхаживании новорожденных, начиная с 22 недель гестации, обуславливает особую значимость изучения механизмов

функционирования иммунной системы глубоко недоношенных детей. И более того, их иммунная система может подвергаться и дальнейшему воздействию неблагоприятных факторов, приводя к еще большему ее угнетению. У них отмечается нарушение как врожденного, так и адаптивного иммунитета, что может сопровождаться индукцией иммунной толерантности и ослаблением защитных реакций противoinфекционного иммунитета [1] и как следствие к развитию инфекционно-воспалительных заболеваний. Среди иммунных механизмов, обеспечивающих первые этапы противoinфекционной защиты, наибольший интерес представляют реакции врожденного иммунитета, особенно связанные с начальными этапами развития иммунного ответа, т.е. с процессом распознавания патогенов. Ключевым моментом в этом процессе является взаимодействие между патоген-ассоциированными молекулярными паттернами (PAMP), широко представленными в структуре большинства бактерий и вирусов и паттерн-распознающими рецепторами (PRR), представленными на клетках иммунной системы, осуществляющих реакции врожденного иммунитета. Это взаимодействие запускает передачу активационных сигналов, ведущих к выработке провоспалительных цитокинов и развитию каскада инфекционно-воспалительных реакций, направленных на блокирование жизнедеятельности, дезинтеграцию и удаление патогена из организма. Некоторые из этих рецепторов опосредуют реакции эндо- и фагоцитоза, например рецепторы комплемента (интегрины) и FcR. Другие, такие как Toll-like рецепторы (TLR) - инициируют активацию клеток врожденного иммунитета. Все это обуславливает актуальность исследований, посвященные изучению этой проблемы.

В связи с этим целью **проведенного** исследования было выявить особенности экспрессии Toll-like рецепторов 2-, 4-, 9-типов (TLR2, TLR4, TLR9), CD11b (β 2 интегрин) и CD16 молекул (Fc γ RIII) моноцитами и нейтрофилами у недоношенных новорожденных.

Материалы и методы исследования.

В перинатальном центре ФГБУ «Ивановский НИИ материнства и детства им.В.Н.Городкова» МЗ РФ проводилось обследование 77 новорожденных в 1-2 сутки жизни. В исследование вошли 11 новорожденных 34-37 недель гестации (масса тела при рождении 1550-2390г), 38 новорожденных 31-33 недель гестации (масса тела при рождении 1257-2250г), 15 детей 29-30 недель гестации (масса тела при рождении 950-1800г) и 13 детей 22-28 недель гестации (масса тела при рождении 490-1080г).

Методом проточной трехцветной цитофлюориметрии в периферической крови новорожденных определяли относительное содержание моноцитов (CD14+CD45+) и нейтрофилов (CD14-CD45+), экспрессирующих TLR2, TLR4, TLR9, CD11b и CD16 молекулы. В работе использовались моноклональные антитела анти-CD14 PE-Cyanine7,

анти-CD45 PerCP-Cyanine5.5, анти-CD282(TLR2) FITC, анти-CD284(TLR4) Alexa Fluor 488, анти-CD289(TLR9) PE, анти-CD11b FITC (eBioscience, USA) и анти-CD16 PE (Beckman Coulter, France). Результаты анализировали на проточном цитофлюориметре FACSCantoII в программе FACSDiva (Becton Dickinson, USA).

Все женщины подписывали информированное согласие на проведение иммунологического обследования ребенка. Работа была одобрена этическим комитетом ФГБУ «Ивановский НИИ материнства и детства им. В.Н. Городкова» МЗ РФ.

Статистическая обработка полученных данных проводилась методом вариационной статистики с использованием программы Microsoft Excell из комплекта Microsoft Office 2000. Достоверность различий между показателями независимых выборок оценивалась по t-критерию.

Результаты исследования и их обсуждение

Механизмы взаимодействия патоген-ассоциированных молекул с паттерн-распознающими рецепторами в последнее время привлекают пристальное внимание исследователей во всем мире. Однако работы, посвященные изучению этого аспекта функционирования врожденного иммунитета у новорожденных, в большинстве своем рассматривают проблему без учета гестационного возраста и степени зрелости иммунной системы новорожденного. По данным литературы для здоровых доношенных новорожденных характерно незначительное снижение экспрессии TLR2 фагоцитами, при отсутствии существенных различий в экспрессии TLR4 по сравнению с показателями взрослых доноров [2]. В некоторых работах отмечается отсутствие стимулирующего эффекта LPS на экспрессию CD14 и TLR4 моноцитами доношенных новорожденных [3], в других показано усиление экспрессии TLR4 моноцитами пуповинной крови после стимуляции LPS, сопоставимое с таковым у взрослых доноров [4].

Результаты нашего исследования экспрессии TLR моноцитами и нейтрофилами периферической крови новорожденных разной степени недоношенности представлены в таблица 1.

Таблица 1

Экспрессия TLR2, TLR4, TLR9 молекул моноцитами и нейтрофилами новорожденных различного гестационного возраста.

Срок гестации	TLR2+, %	TLR4+, %	TLR9+, %
Моноциты			
34-36 недели	84,15±3,02	78,33±3,53	46,90±5,49
31-33 недели	76,75±2,45	78,25±2,40	48,35±3,45
29-30 недель	76,65±4,02	75,91±3,30	43,44±5,20

22-28 недели	70,51±3,96 p ₁ <0,02	67,30±4,10 p ₁ <0,05 p ₂ <0,05	31,14±3,91 p ₁ <0,05 p ₂ <0,01
Нейтрофилы			
34-36 недели	78,66±4,28	76,13±3,40	31,70±3,79
31-33 недели	73,10±2,58	68,13±2,50	37,44±4,66
29-30 недель	72,31±4,37	67,49±3,50	27,99±3,02
22-28 недели	63,06±3,21 p ₁ <0,01 p ₂ <0,05	64,62±4,04 p ₁ <0,05	35,15±5,69

p₁ - коэффициент достоверности разности результатов по сравнению с группой новорожденных 34-36 недель гестации.

p₂ - коэффициент достоверности разности результатов по сравнению с группой новорожденных 31-33 недель гестации.

Установлено, что у новорожденных 22-28 недель гестации в крови отмечалось снижение уровня моноцитов, экспрессирующих TLR2 (p<0,02), TLR4 (p<0,05) и TLR9 (p<0,05) по сравнению с показателями новорожденных 34-36 недель гестации. Следует отметить, что содержание в крови TLR4+ и TLR9+ моноцитов у детей 22-28 недель гестации было существенно ниже и по сравнению с показателями новорожденных 31-33 недель гестации (p<0,05 и p<0,01, соответственно), но не имело статистически значимых различий с показателями младенцев 29-30 недель гестации. Средние значения показателей содержания TLR2+, TLR4+ и TLR9+ моноцитов в подгруппах новорожденных со сроком гестации 34-36 недель, 31-33 недели и 29-30 недель практически не различались между собой (p>0,05 во всех случаях).

Экспрессия TLR на нейтрофилах у детей разной степени недоношенности имела несколько иные закономерности. Так, у детей 22-28 недель гестации уровень TLR2+ нейтрофилов был достоверно ниже, чем у новорожденных 34-36 и 31-33 недель гестации (p<0,01 и p<0,05, соответственно), в то время как снижение относительного содержания TLR4+ нейтрофилов отмечалось только относительно показателей новорожденных 34-36 недель гестации (p<0,05). Уровень TLR9+ нейтрофилов в крови новорожденных существенно не менялся в зависимости от срока гестации и оставался практически одинаковым (p>0,05 во всех случаях). Содержание TLR2+ и TLR4+ нейтрофилов не имело достоверных различий в 29-30, 31-33 и 34-36 недель гестации (p>0,05 во всех случаях), однако для групп недоношенных детей 29-30, 31-33 недель гестации были характерны

тенденции к его снижению по сравнению с показателями почти новорожденных 34-36 недель гестации.

Следует отметить, что наиболее низкие значения экспрессии TLR на моноцитах и нейтрофилах отмечались у новорожденных 22-28 недель гестации. Начиная с 29-30 недель гестации, отмечалась выраженная тенденция к повышению уровня клеток экспрессирующих TLR2 и TLR4 и в популяции моноцитов, и в популяции нейтрофилов. Проведенный анализ данных содержания TLR-позитивных нейтрофилов и моноцитов показал, что группы новорожденных 29-30 и 31-33 недель гестации были неоднородными по индивидуальным значениям данных показателей. Так, показатели содержания TLR2+ и TLR4+ клеток были сниженными и соответствовали средним значениям, характерным для недоношенных 22-28 недель гестации у новорожденных 29-30 недель гестации в 20% случаев в популяции моноцитов и в 40% случаев в популяции нейтрофилов, а в группе детей 31-33 недель гестации в 21% случаев в популяции моноцитов и в 32% случаев в популяции нейтрофилов. То есть выраженные изменения в экспрессии TLR на моноцитах и нейтрофилах наблюдались в большей степени у глубоко недоношенных новорожденных и в меньшей степени затрагивали более доношенных детей.

Противоречивость литературных данных об экспрессии PRR и продукции цитокинов фагоцитами периферической крови недоношенных новорожденных по сравнению с доношенными новорожденными, вероятно, в значительной степени определяется подбором клинических групп обследованных детей. Так, одни авторы не выявили изменений в экспрессии TLR2 [5, 6] и TLR4 [7] моноцитами недоношенных новорожденных. Другие, наоборот, показали снижение уровня TLR2+ [8] и TLR4+ [5, 6] моноцитов в периферической крови недоношенных новорожденных. Наши данные в большей степени согласуются с результатами тех исследователей, которые выявили снижение уровня TLR2+ и TLR4+ нейтрофилов, и TLR4+ моноцитов, характерное для новорожденных с экстремально низкой массой тела при рождении (ЭНМТ), что соответствует глубокой степени их недоношенности [5, 6, 7]. Установленное нами снижение уровня TLR2+, TLR4+ нейтрофилов и моноцитов, и TLR9+ моноцитов показывает, что у новорожденных 22-28 недель гестации, и, частично у недоношенных 29-30 и 31-33 недель гестации, нарушаются механизмы распознавания патогенов как бактериального, так и вирусного происхождения.

Известно, что при связывании PAMP с TLR передается транскрипционный сигнал, направляющий выработку цитокинов, осуществляющих борьбу с инфекцией. Вероятно, установленное нами нарушение TLR-опосредованного распознавания патогена, является основной причиной снижения сывороточного уровня IL-1Ra, IL-2, IL-8, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, IFN γ , MIP-1 α , MCP-1, TNF α , установленного Lusyati S. с соавт. (2013) [9], а также

продукции и секреции провоспалительных цитокинов (IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF α) клетками макрофагального ряда в ответ на стимуляцию PAMP у недоношенных новорожденных по сравнению с доношенными новорожденными и взрослыми донорами [5, 6].

Исследование экспрессии PRR моноцитами и нейтрофилами, характеризующих иной механизм их взаимодействия с PAMP, показало, что для группы недоношенных новорожденных 22-28 недель гестации было характерным достоверное снижение содержания моноцитов и нейтрофилов, экспрессирующих молекулы CD16 (Fc γ RIII) как по сравнению с показателями новорожденных 34-37 недель гестации ($p < 0,05$ в обоих случаях), так и по сравнению с показателями новорожденных 31-33 недель гестации ($p < 0,05$ и $p < 0,01$, соответственно) (таблица 2).

Таблица 2

Экспрессия CD11b и CD16 молекул моноцитами и нейтрофилами новорожденных различного гестационного возраста.

Срок гестации	CD11b+, %	CD16+, %
Моноциты		
34-36 недели	76,86 \pm 5,27	62,61 \pm 4,72
31-33 недели	82,66 \pm 2,22	58,76 \pm 3,09
29-30 недели	81,69 \pm 3,51	59,65 \pm 4,40
22-28 недели	76,33 \pm 4,52	48,32 \pm 3,77 $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$
Нейтрофилы		
34-36 недели	84,98 \pm 4,66	86,14 \pm 2,91
31-33 недели	87,47 \pm 2,49	86,11 \pm 1,59
29-30 недели	90,89 \pm 2,09	79,56 \pm 3,15
22-28 недели	82,68 \pm 3,55	76,25 \pm 2,75 $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,01$

p_1 - коэффициент достоверности разности результатов по сравнению с группой новорожденных 34-36 недель гестации.

p_2 - коэффициент достоверности разности результатов по сравнению с группой новорожденных 31-33 недель гестации.

Достоверных различий в содержании CD16+ моноцитов и нейтрофилов не отмечалось между группами недоношенных новорожденных: 22-28 и 29-30 недель гестации ($p > 0,05$); 29-30, 31-33 и 34-36 недель гестации ($p > 0,05$ во всех случаях). Содержание CD11b+ моноцитов

и нейтрофилов во всех сравниваемых группах новорожденных не имело достоверных различий ($p > 0,05$ во всех случаях). Индивидуальный анализ данных содержания CD16+ клеток показал, что низкие значения содержания CD16+ моноцитов (соответствующие таковым в группе недоношенных новорожденных 22-28 недель гестации) отмечались у 40% детей 29-30 недель гестации и у 50% детей 31-33 недель гестации. Сниженный уровень CD16+ нейтрофилов был выявлен у 33% детей 29-30 недель гестации и у 20% детей 31-33 недель гестации.

Данные о характере экспрессии Fc-рецепторов и C3-рецепторов моноцитами и нейтрофилами недоношенных новорожденных свидетельствуют о том, что у глубоко недоношенных новорожденных 22-28 недель гестации и в некоторой степени у недоношенных старше 28 недель гестации, в основном страдает функция опсонизированного фагоцитоза. Следует отметить, что по данным литературы плазма недоношенных детей обладает значительно более низкой опсонизирующей емкостью к некоторым бактериальным патогенам, чем у доношенных новорожденных [7]. В большей степени это проявлялось в группе детей с экстремально низкой массой тела при рождении [7].

Заключение. Таким образом, в нашем исследовании мы выявили некоторые особенности экспрессии паттерн-распознающих рецепторов моноцитами и нейтрофилами, зависящие от гестационного возраста новорожденных. В максимальной степени угнетение функции распознавания и фагоцитоза патогена проявлялось у глубоко недоношенных новорожденных 22-28 недель гестации, и постепенно ослабевало с увеличением гестационного возраста ребенка.

Как показывает практика, в значительном числе случаев досрочное прерывание беременности и рождение детей с очень низкой и экстремально низкой массой тела при рождении обусловлено развитием воспалительных реакций в плаценте, амниотической жидкости, плодовых оболочках [1] в результате бактериального и/или вирусного инфицирования. Этот процесс сопровождается и внутриутробным инфицированием новорожденных, которое отмечается у 83% детей с массой тела менее 1000 г при рождении и лишь у 10% детей, превышающих 2500 г [1].

В настоящее время трудно однозначно ответить на вопрос, чем может в большей степени определять снижение уровня патоген-распознающих клеток у недоношенных малых гестационных сроков. С одной стороны укорочение периода внутриутробного развития сопровождается морфологической и функциональной незрелостью многих органов и систем, в том числе и иммунной системы. С другой стороны можно предположить, что находясь в длительном контакте с патогеном еще во внутриутробном состоянии, иммунная система плода исчерпывает свои возможности в результате сброса или интернализации PRR

фагоцитами, либо в результате ускоренного прохождения клетками всего процесса созревание → активация → реализация функции → апоптоз. Наиболее вероятным представляется предположение, что именно неполноценность реакций иммунной системы у глубоко недоношенных новорожденных определяет их особую подверженность инфекционно-воспалительным заболеваниям, протекающих длительно и в очень тяжелой форме.

Список литературы

1. Melville J.M., Moss T.J.M. The immune consequences of preterm birth//*Neuroendocrine Science*.2013.[Vol.7.-Art.79 <http://www.frontiersin.org>
2. Expression of Toll-like receptors in neonatal sepsis/ D. Viemann, G. Dubbel, S. Schleifenbaum, E. Harms et al. // *Pediatric Research*.-2005.Vol. 58,№4.-P.654-659
3. Role of MyD88 in diminished tumor necrosis factor alpha production by newborn mononuclear cells in response to lipopolysaccharide/ S.R. Yan, G. Qing, D.M. Byers, A.W. Stadnyk et al. //*Infect Immun*.-2004.Vol.72.-P.1223–1229.
4. Postnatal development of monocyte cytokine responses to bacterial lipopolysaccharide. S.T. Yerkovich, M.E. Wikström, D. Suriyaarachchi, S.L. Prescott S.L. et al.// *Pediatric Research*.-2007.Vol.62,№5.=P.547-552.
5. Monocyte toll-like receptor 4 expression and LPS-induced cytokine production increase during gestational aging/ E. Förster-Waldl, K. Sadeghi, D. Tamandl, B. Gerhold// *Pediatric Research*.-2005.Vol.58,№1.-P.121-124.
6. Immaturity of infection control in preterm and term newborns is associated with impaired toll-like receptor signaling / K. Sadeghi, A. Berger, M. Langgartner, A.R.Prusa et al.// *J. Infect. Dis*.- 2007.Vol.195,№2.-P.296-302.
7. Innate immune deficiency of extremely premature neonates can be reversed by interferon- γ / P. Tissieres, A. Ochoda, I. Dunn-Siegrist, G.ve Drifte et al.// *PLoS ONE*. March 2012.Vol.7.- e32863 | <http://www.plosone.org>
8. Thornton N.L. Toll-like receptor 1/2 stimulation induced elevated interleukin-8 secretion in polymorphonuclear leucocytes isolated from preterm and term newborn infants / M.J. Cody, C.C. Yost//*Neonatology*.-2012.Vol.101,№2.-P.140-146
9. Levels of 25 cytokines in the first seven days of life in newborn infants/ S. Lusiyati, C.V. Hulzebos, J. Zandvoort, P.J.J S. Lusiyati et al. //*BMC Research Notes*. 2013.Vol.6.-547 <http://www.biomedcentral.com>

Рецензенты:

Анциферова Ю.С., д.б.н., старший научный сотрудник лаборатории клинической иммунологии, ФГБУ «Ивановский НИИ материнства и детства им.В.Н.Городкова» МЗ РФ, г. Иваново;

Панова Ирина Александровна, доктор медицинских наук, заведующая отделом акушерства и гинекологии, ФГБУ «Ивановский НИИ материнства и детства им.В.Н.Городкова» МЗ РФ, г. Иваново.