

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Дмитриев, В. В. Практическая коагулогия / В. В. Дмитриев. — Минск: Бел. наука, 2004. — 544 с.
2. Оценка нарушений гемостаза у недоношенных новорожденных / Г. Н. Кузьменко [и др.] // Рос. педиатр. журн. — 2009. — № 5. — С. 4–8.
3. Третьякова, О. С. Современные подходы к диагностике и лечению тромбоцитопений новорожденных / О. С. Третьякова // Здоровье ребенка. — 2006. — № 1. — С. 41–44.
4. Чупрова, А. В. Система неонатального гемостаза в норме и при патологии / А. В. Чупрова // Бюлл. РАМН. — 2005. — № 4. — С. 13–19.
5. Hematologic Problems of the Neonate / R. J. Hutchinson [et al.]. — Philadelphia, 2000. — 453 p.

УДК 616.155.3-002

**РАСТВОРИМАЯ ФОРМА РЕЦЕПТОРА ИНТЕРЛЕЙКИНА-8 CXCR2
В КАЧЕСТВЕ МАРКЕРА ВОВЛЕЧЕНИЯ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ЛЕЙКОЦИТОВ
КРОВИ ЧЕЛОВЕКА В ЛОКАЛЬНЫЙ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫЙ ПРОЦЕСС**

**Ю. В. Котлинская¹, К. В. Котлинский¹, С. Т. Акалович²,
А. В. Воробей³, Ю. Н. Орловский³, Т. М. Дорошенко⁴**

¹Республиканский научно-практический центр гематологии и трансфузиологии, г. Минск

²Белорусская медицинская академия последипломного образования, г. Минск

³Республиканский центр реконструктивной хирургической гастроэнтерологии,
колопроктологии и лазерной хирургии, г. Минск

⁴Минская областная клиническая больница, г. Минск

Снижение уровня экспрессии хемотактического рецептора CXCR2 при активации нейтрофилов сопровождается появлением растворимого CXCR2 (pCXCR2) в клеточном супернатанте. В настоящей работе в перитонеальной жидкости больных с острым перитонитом и смывах из брюшной полости больных при диагностической лапароскопией по поводу заболеваний, не связанных с воспалением органов брюшной полости (контрольная группа), исследовано содержание pCXCR2, интерлейкина-6 (ИЛ-6) и α -дефензинов (human neutrophil peptides, HNP). Было показано, что уровень pCXCR2, HNP и ИЛ-6 в перитонеальной жидкости в остром послеоперационном периоде болезни достоверно повышен по сравнению с контрольной группой. Была выявлена положительная корреляция pCXCR2 с HNP ($r = 0,72$, $p < 0,001$) и ИЛ-6 ($r = 0,64$, $p < 0,05$) в перитонеальной жидкости больных и смывах из брюшной полости пациентов контрольной группы. Мы предполагаем, что определение pCXCR2 в перитонеальной жидкости наряду с ИЛ-6 и HNP, может служить дополнительным диагностическим инструментом раннего распознавания интраабдоминальных осложнений перитонита.

Ключевые слова: растворимый рецептор интерлейкина-8 CXCR2, нейтрофилы, острый перитонит, интерлейкин-6, α -дефензины.

**SOLUBLE FORM OF INTERLEUKIN-8 CXCR2 RECEPTOR
AS A MARKER OF THE LOCAL INFLAMMATORY INVOLVEMENT
OF THE HUMAN BLOOD NEUTROPHIL LEUKOCYTES**

**Yu. V. Kotlinskaya¹, K. V. Kotlinskiy¹, S. T. Akalovich²,
A. V. Vorobei³, Yu. N. Orlovskiy³, T. M. Doroshenko⁴**

¹Republican Research Centre for Hematology and Transfusiology, Minsk

²Belarussian Medical Academy for Postgraduate Education, Minsk

³Republican Centre for Reconstructive Surgical Gastroenterology,
Coloproctology and Laser Surgery, Minsk

⁴Minsk Regional Clinical Hospital

The decreased level of the chemotactical receptor CXCR2 expression is accompanied by the emergence of soluble CXCR2 (pCXCR2) in cellular supernatant in neutrophil activation. The content of pCXCR2, interleukin-6 (IL-6) and α -defenzins (human neutrophil peptides, HNP) has been studied in the peritoneal fluid of patients with acute peritonitis and lavages from abdominal cavity in diagnostic laparoscopy for the diseases that are not related to the abdominal organ inflammation (control group). It was shown that the levels of pCXCR2, HNP and IL-6 in the peritoneal fluid were reliably higher in the comparison with the level of the control group in the acute postoperative period of the disease. The positive correlation between pCXCR2 and HNP ($r = 0,72$, $p < 0,001$) and IL-6 ($r = 0,64$, $p < 0,05$) was detected in the peritoneal fluid of the patients and the lavages from the abdominal cavity of the patients of the control group. We assume that the detection of pCXCR2 in the peritoneal fluid alongside with IL-6 and HNP can serve as an additional diagnostic tool for the early recognition of intra-abdominal peritonitis complications.

Key words: soluble interleukin-8 CXCR2 receptor, neutrophils, acute peritonitis, interleukin-6, α -defenzins.

Введение

Полиморфноядерные нейтрофилы (ПМН) крови играют центральную роль в антибактериальной защите организма. Антибактериальная функция ПМН связана с их миграцией из кровотока в ткани под действием специализированных хемотаксических белков. Интерлейкин-8 (ИЛ-8) является основным хемотаксическим цитокином для ПМН при воспалении. ИЛ-8 действует на клетки через мембранные рецепторы первого (CXCR1) и второго (CXCR2) типов [5]. CXCR2 отвечает за хемотаксис, а CXCR1 за проявление микробицидной активности ПМН [12]. Нами было впервые показано, что снижение уровня экспрессии хемотаксического рецептора ИЛ-8 CXCR2 на поверхности нейтрофилов при фагоцитозе микроорганизмов, под действием фактора некроза опухолей α (ФНО) или липополисахарида сопровождается появлением растворимого CXCR2 (pCXCR2) в супернатанте активированных клеток [1, 2, 4]. Открытие этого явления позволило предположить, что pCXCR2 может служить в качестве маркера падения экспрессии CXCR2 на нейтрофилах *in vitro* и *in vivo*, т. е. маркером их дисфункции при различных патологических и физиологических процессах.

В наших предыдущих исследованиях в качестве модели локального воспалительного процесса, ведущую роль в котором играют ПМН, мы использовали острую фазу послеоперационного перитонита с последующим выздоровлением. Проведенный нами анализ перитонеального экссудата больных с острым послеоперационным перитонитом позволил выявить высокий уровень pCXCR2 в острой фазе заболевания и статистически значимое его снижение при выздоровлении [1].

По сравнению с уровнями цитокинов в плазме, их уровень в перитонеальной жидкости существенно повышается после обширных хирургических операций на органах брюшной полости, что может служить действенным методом для контроля развития послеоперационной воспалительной реакции. После хирургических вмешательств повышение уровня таких цитокинов как ИЛ-1 β , ИЛ-6, ФНО в перитонеальной жидкости может свидетельствовать о тяжелых интраабдоминальных осложнениях [9]. В исследовании Yamamoto и соавт. [14] показано, что уровень ИЛ-6, одного из важнейших медиаторов острой фазы воспаления, в перитонеальной жидкости больных, подвергшихся операции на органах брюшной полости, положительно коррелирует с длительностью операции и кровопотерей во время операции, что согласуется с ранее полученными данными [13]. Таким образом, на послеоперационный уровень перитонеальных цитокинов значительное влияние оказывает степень хирургического стресса.

Нейтрофилы участвуют в воспалительных реакциях не только как фагоциты, но и как

клетки, выделяющие микробицидные факторы (эластаза, катепсин G, азуроцидин и др.). Важнейшим микробицидным агентом нейтрофилов являются небольшие катионные белки α -дефензины (human neutrophil peptides, HNP) с широким спектром антибактериальной активности [8]. Высокий уровень дефензинов обнаружен в перитонеальной жидкости при остром локальном воспалении [7].

Цель исследования

Оценка уровней растворимого CXCR2 в комплексе с ИЛ-6 и HNP, а также поиск их возможной взаимосвязи при локальном воспалительном процессе у больных с острым перитонитом по сравнению с группой пациентов, подвергшихся диагностической лапароскопии.

Материалы и методы исследования

В работе использованы перитонеальная жидкость больных с острым перитонитом и смывы из брюшной полости больных при диагностической лапароскопии по поводу заболеваний, не связанных с воспалением органов брюшной полости, госпитализированных в УЗ «Минская областная клиническая больница» в 2010–2011 гг. В 1-ю группу вошли пациенты, у которых перитонит возник после полостного оперативного вмешательства на кишечнике (послеоперационный перитонит). Возраст пациентов (8 мужчин и 2 женщины) на момент сбора образцов в среднем составил 55,4 года (от 30 до 78 лет). Взятие образцов осуществлялось в ранний послеоперационный период (1–2-е сутки после операции). Во 2 (контрольную) группу объединены 8 пациентов, подвергшихся диагностической лапароскопии. При заборе клинического материала у всех участников данного исследования получено информированное согласие. После сбора образцы центрифугировали (400 g) и хранили при -20°C .

Содержание pCXCR2 и HNP определяли ранее разработанными в нашей лаборатории твердофазными иммуноферментными методами [2, 11]. Исследование ИЛ-6 проводили с помощью набора реактивов «ИФА-ИЛ-6» (ООО «Цитокин», Санкт-Петербург). Статистический анализ полученных результатов проводили с использованием пакета прикладных программ «Statistica» 6.0. Зависимость между группами определяли с помощью корреляционного коэффициента (r) и коэффициента Спирмена (R). Различия считали достоверными при значении $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

Исследование концентрации pCXCR2, HNP и ИЛ-6 в перитонеальной жидкости в остром послеоперационном периоде болезни позволило выявить достоверное повышение уровня всех факторов по сравнению с контрольной группой (таблица 1). Повышение уровня HNP и ИЛ-6 в перитонеальной жидкости ранее описано и кор-

релирует с тяжестью состояния, выраженностью симптомов системного воспалительного ответа и может использоваться в качестве до-

полнительного прогностического критерия частоты возникновения послеоперационных осложнений [9, 13, 14].

Таблица 1 — Содержание рCXCR2, ИЛ-6 и HNP в перитонеальной жидкости больных острым послеоперационным перитонитом (1-я группа) и смывах больных, подвергшихся диагностической лапароскопии (2-я группа)

Группы пациентов	Уровень факторов (среднее значение \pm SEM)		
	рCXCR2 (нг/мл)	ИЛ-6 (нг/мл)	HNP (мкг/мл)
1-я группа	9,24 \pm 1,16*	72,76 \pm 18,38*	48,68 \pm 8,6*
2-я группа	0,12 \pm 0,05	0,83 \pm 0,49	3,35 \pm 3,12

Примечание: * Достоверность различий между 1-й и 2-й группой.

При проведении корреляционного анализа содержания рCXCR2 с HNP и ИЛ-6 в перитонеальной жидкости больных и смывах из брюшной полости пациентов контрольной группы

была выявлена положительная корреляция с обоими факторами ($R = 0,84$, $p < 0,001$; $r = 0,72$, $p < 0,001$) и ($R = 0,91$, $p < 0,001$; $r = 0,64$, $p < 0,05$), соответственно (рисунок 1).

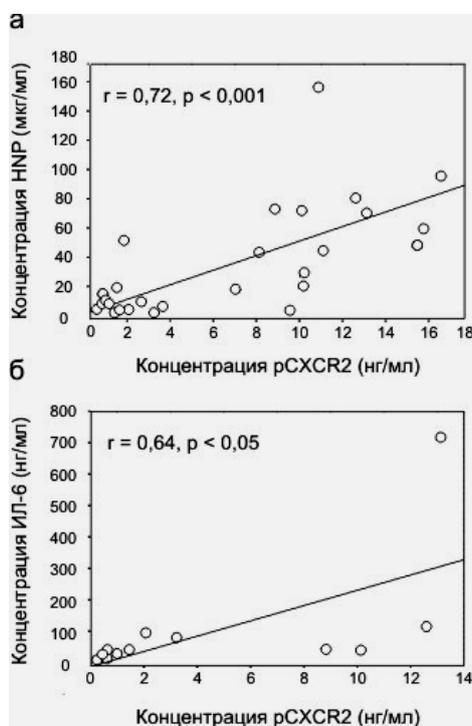


Рисунок 1 — Результат корреляционного анализа между рCXCR2 и HNP (а), между рCXCR2 и ИЛ-6 (б)

Ранее нами было показано, что анионный гликозилированный рCXCR2 стимулирует синтез тотального иммуноглобулина в культуре периферических мононуклеарных клеток крови человека *in vitro* [3]. Мы предположили, что рCXCR2 способен стимулировать выделение моноцитарных факторов, усиливающих синтез иммуноглобулинов В-лимфоцитами, например, ИЛ-6 [3]. Наличие корреляции между рCXCR2 и ИЛ-6 подтверждает ранее выдвинутую нами гипотезу о проявлении биологической активности растворимым CXCR2 в месте локального воспаления *in vivo*. Таким образом, рCXCR2 может служить новым гранулоцитарным фак-

тором, модулирующим активность мононуклеарных клеток при развитии воспалительной реакции в ответ на проникновение патогенных микроорганизмов, в которой принимают участие нейтрофилы, моноциты и В-лимфоциты.

Известно, что уровень HNP в плазме и других биологических жидкостях пациентов с воспалительными заболеваниями значительно повышен по сравнению со здоровыми донорами [10]. HNP высвобождаются во внеклеточное пространство в результате дегрануляции нейтрофилов, гибели клеток или их лизиса при воспалении [6]. Ранее нами было показано, что высокий плазменный уровень HNP и ИЛ-8, ос-

нового лиганда для CXCR2, коррелировал с неблагоприятным прогнозом и летальностью в группе критически больных пациентов с системным воспалительным ответом. Наличие тесной положительной корреляции между pCXCR2 и HNP, являющихся маркером активации нейтрофилов, свидетельствует о лейкоцитарном происхождении pCXCR2 в локальном участке воспаления, поскольку именно на ПМН экспрессируется наибольшее количество рецепторов CXCR2, которые при активации нейтрофилов ФНО, липополисахаридом или фагоцитарными стимулами протеолитически отщепляются с поверхности клеток и переходят в растворимую форму. Мы предполагаем, что в сайте воспаления могли бы формироваться комплексы анионного pCXCR2 с катионными HNP, модулируя эффекты друг друга.

Заключение

Таким образом, pCXCR2, образующийся в месте воспаления может участвовать в защит-

ных иммунных реакциях *in vivo*. В нашем исследовании у двух умерших пациентов, повторно оперированных из-за развившихся хирургических осложнений и исключенных из исследования, высокое содержание HNP в перитонеальной жидкости (95,01 и 34,06 мкг/мл) сопровождалось низкой концентрацией pCXCR2 (0,29 и 0,12 нг/мл), соответственно. Это может свидетельствовать о большом количестве функционально неактивных нейтрофилов, обусловленном массовой гибелью клеток под действием бактериальных продуктов и медиаторов воспаления, которая сопровождалась нарушением отщепления CXCR2 с поверхности ПМН.

Мы предполагаем, что определение pCXCR2 в перитонеальной жидкости наряду с ИЛ-6 и HNP, может служить дополнительным диагностическим инструментом раннего распознавания интраабдоминальных осложнений перитонита.

УДК 612.112.95

СТИМУЛЯЦИЯ СИНТЕЗА ИНТЕРЛЕЙКИНА-8 В КУЛЬТУРЕ МОНОЦИТОВ ПОД ДЕЙСТВИЕМ РАСТВОРИМОГО РЕЦЕПТОРА ИНТЕРЛЕЙКИНА-8 CXCR2

К. В. Котлинский¹, Ю. В. Котлинская¹, Н. Н. Войтенко²

¹Республиканский научно-практический центр гематологии и трансфузиологии, г. Минск
²Фонд развития молекулярной гематологии и иммунологии, г. Москва

Интерлейкин-8 (ИЛ-8) является основным хемотактическим фактором для полиморфноядерных нейтрофилов (ПМН) при воспалении. Ранее нами было показано, что стимуляция ПМН *in vitro* вызывает резкое снижение экспрессии рецептора ИЛ-8 второго типа CXCR2 на мембране ПМН и появление растворимого гликопептида CXCR2 (pCXCR2) в супернатанте. В данной работе мы изучили влияние pCXCR2 на синтез ИЛ-8 в культуре моноцитов крови и бронхоэпителиальных клеток человека А549. Было показано, что pCXCR2 достоверно стимулировал синтез ИЛ-8 в культуре моноцитов с выраженным дозозависимым эффектом. В культуре бронхоэпителиальных клеток человека А549 pCXCR2 не вызывал синтеза ИЛ-8. Действие pCXCR2 на моноциты не было связано с загрязнением препарата липополисахаридом и было обусловлено наличием как белковой, так и углеводными частями в составе молекулы pCXCR2.

Ключевые слова: растворимый рецептор интерлейкина-8 CXCR2, моноциты крови человека, бронхоэпителиальные клетки человека А549, интерлейкин-8

STIMULATION OF INTERLEUKIN-8 SYNTHESIS IN MONOCYTE CULTURE UNDER SOLUBLE INTERLEUKIN-8 CXCR2 RECEPTOR

K. V. Kotlinskiy¹, Yu. V. Kotlinskaya¹, N. N. Voitenok²

¹Republican Research Centre for Hematology and Transfusiology, Minsk
²Fund for Molecular Hematology and Immunology, Moscow

Interleukin-8 (IL-8) is the main chemotactical factor for polymorphonuclear neutrophils (PMN) in inflammation. We have already shown that PMN stimulation *in vitro* causes a sharp decrease of IL-8 receptor expression of second type CXCR2 on the PMN membrane and an emergence of soluble glycopeptid CXCR2 (pCXCR2) in the supernatant. In this work we have studied the effect of pCXCR2 on IL-8 synthesis in the monocyte culture of the blood and bronchoepithelial human cells A549. It was shown that pCXCR2 reliably stimulated IL-8 synthesis in the monocyte culture with the evident dose-dependent effect. pCXCR2 did not cause IL-8 synthesis in the culture of the bronchoepithelial human cells A549. The influence of pCXCR2 on the monocytes was not related to the lipopolysaccharide contamination of the preparation and was caused by the protein and carbohydrate parts, included in pCXCR2 molecule.

Key words: soluble receptor of interleukin-8 CXCR2, human blood monocytes, bronchoepithelial human cells A549, interleukin-8.