

СОЗРЕВАНИЕ *IN VITRO* ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК ЗДОРОВЫХ ЛИЦ И ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКИМ ОСТЕОМИЕЛИТОМ, ВЫЗВАННЫМ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

Ю.П. Рубцова, Д.Я. Алейник, О.П. Живцов, В.Н. Митрофанов

ФГБОУ ВО Приволжский исследовательский медицинский университет МЗ РФ, Нижний Новгород, Россия

Резюме. В работе представлены результаты сравнительного исследования созревания дендритных клеток, выделенных из мононуклеаров периферической крови, здоровых добровольцев и пациентов с хроническим остеомиелитом. У всех пациентов был выделен *Staphylococcus aureus*. Для созревания дендритные клетки культивировали при стандартных условиях в ростовой среде (RPMI-1640, антибиотики, L-глутамин, 15% телячья эмбриональная сыворотка) в присутствии интерлейкина-4 и гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора с последующим добавлением коктейля стимуляторов, включавшего интерлейкин-1 β , фактор некроза опухоли- α , интерлейкин-6, простагландин E2. Визуальные характеристики дендритных клеток в процессе созревания определяли с помощью инвертированного микроскопа Zeiss ODSERVER.Z1 с программой визуализации изображений AxioVision Rel.4.8, используя световую и фазово-контрастную микроскопию при увеличении $\times 40$, $\times 100$, $\times 200$, $\times 400$, $\times 630$. Определение иммунофенотипа дендритных клеток проводили с использованием панели моноклональных антител: CD80FITC, CD86 (B7–2)PE, HLA-DR PC7 (Beckman Coulter, США), CD14PerCP-Cy5.5, CD83APC, CD40PE-Cy7 (Becton Dickinson, США) с соответствующими изотипическими контролями на цитофлуориметре FACS Canto II (Becton Dickinson, США). Показано, что в процессе созревания дендритные клетки пациентов, так и у условно здоровых доноров, увеличиваются в размерах и приобретают отростчатую форму. Экспрессия CD86, CD83, CD80, CD40 у пациентов с хроническим остеомиелитом выражена ниже, чем экспрессия соответствующих маркеров у условно здоровых добровольцев. После стимуляции дендритных клеток пациентов с остеомиелитом достоверно увеличивается процент клеток CD83⁺ и клеток, несущих костимулирующие молекулы CD86, CD80, CD40. По мере созревания различия, выявленные при исследовании незрелых клеток здоровых добровольцев и пациентов с остеомиелитом, исчезают, и на 10 сут уровень экспрессии ключевых маркеров оказывается на близких по значениям уровнях. При этом экспрессия основного маркера дифференцировки CD83 и костимулирующей молекулы CD80 у пациентов с остеомиелитом увеличивается интенсивнее, чем у здоровых. Таким образом, способность дендритных клеток, выделенных из моноцитов периферической крови, пациентов с хроническим остеомиелитом, вызванным *Staphylococcus aureus*, к созреванию под влиянием активаторов *in vitro* не нарушена. Полученные результаты открывают возможность использования дендритных клеток в качестве естественного, замещающего адъювант компонента при разработке вакцин для лечения хронического остеомиелита.

Ключевые слова: хронический остеомиелит, *Staphylococcus aureus*, дендритные клетки, созревание, фенотипирование, CD-рецепторы.

Адрес для переписки:

Рубцова Юлия Павловна
603950, Россия, Нижний Новгород, пл. Минина и Пожарского, 10/1,
ФГБОУ ВО Приволжский исследовательский медицинский
университет МЗ РФ.
Тел.: 8 (831) 436-66-35 (служебн.); 8 (905) 192-89-77 (моб.).
Факс: 8 (831) 439-01-84.
E-mail: rubincherry@yandex.ru

Contacts:

Julia P. Rubtsova
603950, Russian Federation, Nizhny Novgorod, Minin
and Pozharsky sq., 10/1, Privolzhsky Research Medical University.
Phone: +7 (831) 436-66-35 (office); +7 (905) 192-89-77 (mobile).
Fax: +7 (831) 439-01-84.
E-mail: rubincherry@yandex.ru

Библиографическое описание:

Рубцова Ю.П., Алейник Д.Я., Живцов О.П., Митрофанов В.Н.
Созревание *in vitro* дендритных клеток здоровых лиц и пациентов
с хроническим остеомиелитом, вызванным *Staphylococcus aureus* //
Инфекция и иммунитет. 2019. Т. 9, № 1. С. 87–94. doi: 10.15789/2220-
7619-2019-1-87-94

Citation:

Rubtsova J.P., Aleynik D.Ya., Zhivtsov O.P., Mitrofanov V.N. *In vitro*
dendritic cell maturation isolated from healthy people and patients with
Staphylococcus aureus caused chronic osteomyelitis // Russian Journal
of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2019, vol. 9, no. 1,
pp. 87–94. doi: 10.15789/2220-7619-2019-1-87-94

© Рубцова Ю.П. и соавт., 2019

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-2019-1-87-94>

IN VITRO DENDRITIC CELL MATURATION ISOLATED FROM HEALTHY PEOPLE AND PATIENTS WITH STAPHYLOCOCCUS AUREUS-CAUSED CHRONIC OSTEOMYELITIS

Rubtsova J.P., Aleynik D.Ya., Zhivtsov O.P., Mitrofanov V.N.

Privolzhsky Research Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Nizhny Novgorod, Russian Federation

Abstract. Here we present the data comparing maturation of peripheral blood mononuclear cell-derived dendritic cells (DCs) isolated from healthy volunteers and *Staphylococcus aureus*-positive patients with chronic osteomyelitis. Dendritic cells were cultured in a standard maturation cell medium (RPMI-1640, supplemented with antibiotics, L-glutamine, 15% calf embryonic serum) added with interleukin-4 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, followed by adding a stimulating factor cocktail containing interleukin-1 β , tumor necrosis factor- α , interleukin-6, and prostaglandin E2. Dendritic cell maturation was analyzed by estimating visual characteristics under Zeiss ODSERVER.Z1 inverted microscope using Axiovision Rel.4.8 imaging software as well as light and phase-contrast microscopy at magnification of $\times 40$, $\times 100$, $\times 200$, $\times 400$, $\times 630$. Dendritic cell immunophenotyping was carried out by using a panel of anti-human monoclonal antibodies: anti-CD80 FITC-conjugated, anti-CD86 (B7-2) PE-conjugated, anti-HLA-DR PC7-conjugated (all from Beckman Coulter, USA), anti-CD14 PerCP-Cy5.5-conjugated, anti-CD83 APC-conjugated, anti-CD40 PE-Cy7-conjugated (Becton Dickinson, USA) as well as isotype-matched control antibodies on the FACS Canto II flow cytometer (Becton Dickinson, USA). It was shown that while maturation dendritic cells derived both from patients or volunteers increased in size and underwent dendrite formation. Moreover, expression of CD86, CD83, CD80, and CD40 markers on dendritic cells derived from patients vs. volunteers was lowered. However, DC stimulation resulted in significantly increased percentage of DCs positive for CD83 DCs co-stimulation molecules CD86, CD80, CD40 chronic osteomyelitis. However, such differences found in immature DCs in both groups disappeared upon maturation, so that expression of the key markers on day 10 was maintained at close level. In particular, expression of CD83 differentiation marker and the CD80 co-stimulation molecule on DCs from patients vs. volunteers was increased stronger. Thus, a maturation potential in DCs isolated from patients with *Staphylococcus aureus*-caused chronic osteomyelitis was not impaired *in vitro*. The data obtained open up an opportunity to use dendritic cells as a natural adjuvant-substituting component for development of individualized vaccines in treatment and prevention of recurrent chronic osteomyelitis.

Key words: chronic osteomyelitis, *Staphylococcus aureus*, dendritic cells, maturation, phenotyping, CD-receptors.

Введение

Хронический остеомиелит — тяжелое заболевание с рецидивирующим течением, составляющее до 44% всех гнойно-некротических заболеваний конечностей. При открытых переломах трубчатых костей частота развития травматического остеомиелита по данным различных авторов составляет от 2 до 51%, при огнестрельных переломах от 9 до 90%, а после остеосинтеза закрытых переломов длинных костей от 0,2 до 12% [1, 11, 22]. В 35–37,8% случаев хронический остеомиелит приводит к инвалидизации пострадавших [5].

Несмотря на использование активной хирургической тактики и мощной антибиотикотерапии, за последние годы практически не отмечается улучшения результатов лечения и сокращения количества рецидивов у пациентов с хроническим остеомиелитом, которые после оперативного лечения составляют до 34,8% [10, 18]. Тяжесть заболевания, высокий процент рецидивов, отсутствие эффекта от существующей терапии заставляют искать дополнительные подходы к терапии остеомиелитического процесса, основанные на патогенетических механизмах его развития.

Можно предполагать, что существенную роль в патогенезе хронического остеомиелита

играет как исходная иммунокомпрометированность пострадавших, так и длительная персистенция возбудителя, приводящая к многочисленным изменениям в системе иммунитета.

Исследования, посвященные характеру иммунологических сдвигов при хроническом остеомиелите, не очень многочисленны и достаточно противоречивы. Продемонстрированы разнонаправленные отклонения в составе основных популяций лимфоцитов периферической крови: Т-клеток, Т-хелперов, цитотоксических Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов и НК-клеток, обнаружены сдвиги в системе гуморального иммунитета и дисфункция фагоцитарного звена [7, 8, 19, 30, 31, 32]. Указанные данные характеризуют изменения как в системе адаптивного, так и в системе врожденного иммунитета.

В настоящее время известно, что существенное значение для обеспечения необходимой взаимосвязи между системами врожденного и адаптивного иммунного ответа, обеспечения их функционального единства играют дендритные клетки (DC) [23]. Они связаны с окружающей средой через многочисленные молекулярные сенсоры, позволяющие захватывать чужеродные антигены и передавать полученную информацию лимфоцитам. DC специализированные и наиболее мощные антигенпрезентирующие клетки (АПК), с помощью которых

можно получить направленный иммунный ответ [20]. DC происходят из стволовых кровяных клеток и представляют собой гетерогенную группу антигенпрезентирующих клеток [27], среди которых у человека выделяют две основные подгруппы: плазмоцитоидные и классические или обычные DC. В периферической крови преобладают классические DC, которые составляют, как правило, до 90% всех DC. Классические DC рассеяны по лимфоидным и нелимфоидным тканям, мигрируют по лимфатическим сосудам и с током крови. Эти клетки характеризуются выраженной способностью к сбору и презентации антигенов и отличаются по степени зрелости, выделяют незрелые и зрелые DC. Незрелые DC присутствуют в различных тканях и характеризуются высоким эндоцитозом при незначительной экспрессии молекул адгезии и костимулирующих молекул. Поэтому, незрелые DC активно захватывают антигены, но обладают низкой способностью к их представлению. В присутствии факторов созревания эти клетки превращаются в зрелые дендритные клетки.

Зрелые DC отличаются наличием множества отростков, увеличивающих их поверхность и способность к активному передвижению; низкой адгезией к пластику; низкой способностью к эндоцитозу и низкой экспрессией рецепторов для захвата антигенов при высокой экспрессии костимулирующих молекул и молекул адгезии. Зрелые DC являются единственными клетками, которые способны представлять наивным Т-клеткам неизвестные для них ранее антигены, и, в отличие от других антигенпрезентирующих клеток, их стимулирующий эффект на Т-лимфоциты в 10–100 раз сильнее [2, 4].

Полученные данные о взаимодействии антигенпредставляющей клетки, антигена, иммунных структур, уже несколько десятилетий используются для создания дендритноклеточных вакцин, направленных на борьбу с различными хроническими заболеваниями. Проведено большое количество доклинических исследований, в ходе которых были использованы разнообразные способы нагрузки и стимуляции дендритных клеток антигенами *in vitro*. Результаты этой работы в настоящее время применяются в практической медицине для борьбы с хронически текущими процессами, в частности для терапии онкологических заболеваний [16, 20, 24, 25, 28, 34, 35], туберкулеза [12, 15, 21]. Учитывая центральную роль DC как профессиональных и сверхэффективных АПК, представляется перспективным исследование возможности использования их в качестве естественного, замещающего адъювант компонента вакцин при хроническом остеомиелите.

Вместе с тем способность DC, выделенных из моноцитов периферической крови пациентов при этой патологии, к созреванию *in vitro* практически не изучена.

Цель работы: изучить особенности фенотипического созревания DC, выделенных из моноцитов периферической крови пациентов с хроническим остеомиелитом, по сравнению с особенностями созревания DC здоровых добровольцев.

Материалы и методы

Группы обследованных. В работе использовали материал от 6 пациентов с хроническим гнойным остеомиелитом (4 мужчины, 2 женщины) и 6 условно здоровых добровольцев (2 мужчины, 4 женщины). В обеих группах преобладали пациенты работоспособного возраста: в группе пациентов с хроническим гнойным остеомиелитом возраст пациентов колебался от 37 до 67 лет, в группе условно здоровых доноров — от 27 до 51 года.

Все пациенты проходили хирургическое лечение в отделении гнойной хирургии университетской клиники ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России по поводу обострения хронического остеомиелита. Длительность остеомиелитического процесса составляла от 1 года до 7 лет, и у всех пациентов гнойно-воспалительный процесс сопровождался полостными дефектами костной ткани. У каждого пациента из раневого отделяемого был выделен *Staphylococcus aureus*. Пациенты поступали в фазе обострения, и до начала специфической терапии у них забирали кровь для анализа. Протокол исследования был одобрен локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России и утвержден Ученым советом. Каждый человек, включенный в исследование, представил добровольное информированное согласие.

Выделение мононуклеаров. Кровь забирали в вакутайнеры с раствором ЭДТА в общем объеме по 20–50 мл у каждого исследуемого, разводили 1 : 1 фосфатно-солевым буфером (PBS) и использовали для выделения мононуклеаров периферической крови. Выделение мононуклеарной фракции проводили путем градиентного центрифугирования на фиколл-урографинном градиенте ($\rho = 1.077$) при 400g в течение 40 мин. После выделения собирали интерфазные кольца и трижды отмывали PBS, ресуспендировали в ростовой среде RPMI-1640 с добавлением 15% эмбриональной телячьей сыворотки (FBS) (ПанЭко, Москва, Россия), антибиотиков (пенициллин/стрептомицин), глутамин (ПанЭко, Москва, Россия). Подсчитывали концентрацию и жизнеспособность клеток с помощью счетчика клеток «Countes» (Invitrogen, США).

Выделение DC из моноцитов. Для выделения DC из моноцитов периферической крови и оценки их способности к созреванию и дифференцировке в условиях *in vitro* клетки полученной суспензии засеивали с концентрацией 4–4,5 млн в 1 мл ростовой среды на лунку 24-луночного планшета (Corning, США). После посева клетки инкубировали в течение двух часов при t 37°C, 5% CO₂, в увлажненной атмосфере. По окончании инкубации отбрасывали не прилипшие клетки, а к адгезированным на пластике моноцитам добавляли новую ростовую среду, содержащую антибиотики, глутамин, 15% FBS (ПанЭко, Москва, Россия), IL-4 в концентрации 20 нг/мл и GM-CSF в концентрации 100 нг/мл (Sigma-Aldrich, Германия). Планшеты с прикрепившимися клетками культивировали в течение 3 сут при 37°C и 5% CO₂. На третьи сутки культивирования в каждую лунку добавляли еще IL-4 и GM-CSF в той же концентрации без смены среды. Для терминальной дифференцировки на седьмые сутки в контрольных лунках меняли среду RPMI-1640 с добавлением 15% FBS сыворотки (ПанЭко, Москва, Россия), а в опытных лунках при смене среды кроме 15% FBS добавляли коктейль стимуляторов (IL-1 β , TNF α , IL-6, простагландин E₂ (PGE₂) (Sigma-Aldrich, Германия) и оставляли культивировать еще на 48 ч. После активации через 48 ч клетки смывали осторожным пипетированием и с контрольных, и с опытных лунок. Подсчитывали концентрацию и жизнеспособность клеток в каждой группе, используя счетчик клеток «Countess» (Invitrogen, США). Осаждали их центрифугированием при 1500 об./мин в течение 10 мин. Осадок разводили PBS и использовали для фенотипирования.

Определение иммунофенотипа DC. Определение иммунофенотипа DC проводили методом многоцветного анализа с помощью прямой реакции иммунофлуоресценции. В работе использовали панель моноклональных антител: CD80 FITC, CD86 (B7–2) PE, HLA-DR PC7 (Beckman Coulter, США), CD14 PerCP-Cy5.5, CD83APC, CD40PE-Cy7 (Becton Dickinson, США) с соответствующими изотипическими контролями. Фенотипирование проводили на проточном цитофлуориметре FACS Canto II (Becton Dickinson, США). Настройка параметров измерения была выполнена однократно и стандартизируется при помощи частиц для проверки и настройки прибора BD™CS&T Beads (BD Cytometer Setup and Tracking Beads). Окрашенные клетки инкубировали 30 мин и отмывали для дальнейшего определения иммунофенотипа. Результаты выражали в процентном содержании клеток.

Микроскопия культуры. Визуальные характеристики дендритных клеток при культивировании в динамике определяли с помощью ин-

вертированного микроскопа Zeiss OBSERVER. Z1 и программы визуализации изображений AxioVision Rel.4.8, используя световую и фазово-контрастную микроскопию.

Статистика. Для статистической обработки результатов использовали пакет программ STATISTICA 6.0. Результаты исследования обработаны методами непараметрической статистики с применением критерия парных сравнений Вилкоксона и критерия Колмогорова–Смирнова. Различия считали статистически значимыми при вероятности ошибки $p < 0,05$.

Результаты

Микроскопию культуры DC проводили в процессе роста культуры. Незрелые дендритные клетки при наблюдении фиксировались как достаточно крупные клетки округлой или овальной формы, практически без отростков, единичные или образующие малочисленные колонии, адгезированные к поверхности пластика (рис. 1А, Б, III обложка).

Через двое суток после активации DC становятся более крупными с выраженными отростками, начинают открепляться от пластика и формируют многочисленные колонии (рис. 2А, Б, III обложка).

Указанные изменения после активации происходят аналогично и на DC пациентов, и на DC условно здоровых доноров, то есть и у пациентов и условно здоровых DC при созревании увеличиваются в размерах и приобретают отростчатую форму.

Характеристика иммунофенотипа DC. Незрелые DC здоровых добровольцев характеризуются сниженной экспрессией ассоциированных с созреванием молекул CD83, CD80, CD86. После стимуляции у клеток здоровых доноров статистически достоверно возрастает процент клеток, несущих CD83, маркер терминальной дифференцировки, и костимулирующих молекул CD86 и CD80 (табл. 1).

При исследовании фенотипа незрелых DC пациентов с остеомиелитом отмечается практически полное отсутствие клеток, экспрессирующих CD80, и снижение доли CD83-положительных клеток. У большинства обследованных процент клеток, несущих костимулирующие молекулы CD86 и CD40, также снижен (табл. 2).

Сравнение фенотипа незрелых DC с использованием лазерной проточной цитофлуориметрии показало, что экспрессия CD86, CD83, CD80, CD40 у пациентов с хроническим остеомиелитом была ниже, чем экспрессия соответствующих маркеров у условно здоровых доноров.

После стимуляции DC пациентов с остеомиелитом закономерно увеличивается про-

Таблица 1. Экспрессия специфических маркеров на дендритных клетках условно здоровых доноров, % (M±m)

Table 1. Expression of surface markers on volunteer-derived dendritic cells, % (M±m)

Группы n = 6 Groups n = 6	CD14	CD86*	CD83*	HLA-DR	CD80*	CD40
Незрелые DC Immature DCs	22,87±6,38	80,62±2,59	23,22±6,59	95,82±3,06	13,53±4,81	79,48±9,92
Зрелые DC Mature DCs	19,33±8,79	92,02±1,57	75,33±9,93	95,46±1,89	73,93±10,94	94,92±1,48
p-value	0,463072	0,046400	0,027709	0,685831	0,027709	0,115853

Примечание. *p < 0,05 критерий Вилкоксона.

Note. *p < 0.05, according to the Wilcoxon test.

цент клеток CD83⁺, а именно: у большинства обследованных их количество превышает 80%, а у отдельных пациентов достигает 90–95%. Одновременно фиксируется статистически значимое увеличение доли клеток, несущих CD86, CD80, CD40. По мере созревания дендритных клеток различия, выявленные на незрелых клетках у здоровых добровольцев и у пациентов с остеомиелитом, исчезают. На 10 сутки уровень экспрессии ключевых маркеров и у здоровых доноров, и у пациентов гнойного отделения оказывается на близких по значениям уровнях.

Процесс созревания DC из моноцитов крови человека сопровождается изменением экспрессии поверхностных антигенов — CD14 (маркер моноцитов/макрофагов) и CD83 (маркер терминальной дифференцировки). В популяции незрелых DC доля CD14-позитивных клеток выше, чем CD83⁺, а при созревании соотношение меняется на противоположное. Поскольку дифференцировка моноцитов в DC связана с потерей моноцитами CD14 молекул, а созревание незрелых DC в зрелые — с приобретением маркера терминальной дифференцировки CD83, уменьшение доли CD14⁺ клеток и увеличение CD83⁺ клеток является признаком дифференцировки и созревания DC [3]. Среди костимулирующих молекул, которые необходимы для представления антигена на зрелых DC экспрессируются CD40, CD80, CD86. Уровни экспрессии костимулирующих молекул изменяют-

ся по мере созревания DC. CD86 синтезируется на ранних стадиях созревания DC, тогда как CD80 появляется лишь у зрелых DC. Указанная тенденция наблюдалась при созревании DC как у пациентов с хроническим остеомиелитом, так и у здоровых доноров (рис. 3, 4).

Следует отметить, что в процессе созревания *in vitro* экспрессия CD83 у пациентов с остеомиелитом увеличивается в среднем в 4,8 раз против 3,2 — у здоровых доноров, а CD80 в 29 раз, против 5,5 соответственно.

Обсуждение

Известно, что остеомиелит развивается в результате попадания бактерий в костную ткань, надкостницу или костный мозг. Несмотря на то, что все виды бактерий могут вызывать остеомиелит, основным патогенном при хроническом остеомиелите остается стафилококк, преимущественно *Staphylococcus aureus* и, в меньшей степени, *Staphylococcus epidermidis* [29]. Патологическое действие микроорганизмов связано как с их присутствием и жизнедеятельностью в остеомиелитическом очаге, так и с выбросом во внутреннюю среду эндотоксинов. Для обнаружения признаков инфекции DC снабжены рецепторами к молекулярным паттернам патогенов (МПП). Поглощение микроорганизмов и сопутствующее этому распознавание МПП ведут к созреванию DC.

Таблица 2. Экспрессия специфических маркеров на дендритных клетках пациентов с хроническим гнойным остеомиелитом, % (M±m)

Table 2. Expression of surface markers on dendritic cells derived from patients with chronic purulent osteomyelitis, % (M±m)

Группы (n = 6) Groups (n = 6)	CD14*	CD86*	CD83*	HLA-DR	CD80*	CD40*
Незрелые DC Immature DCs	32,50±7,22	57,48±9,68	17,23±7,35	90,10±4,39	2,65±0,91	66,78±13,87
Зрелые DC Mature DCs	10,58±4,99	93,38±2,00	82,45±6,43	97,72±0,52	76,75±10,14	90,12±4,20
p-value	0,027709	0,027709	0,027709	0,074736	0,027709	0,046400

Примечание. *p < 0,05 критерий Вилкоксона.

Note. *p < 0.05, according to the Wilcoxon test.

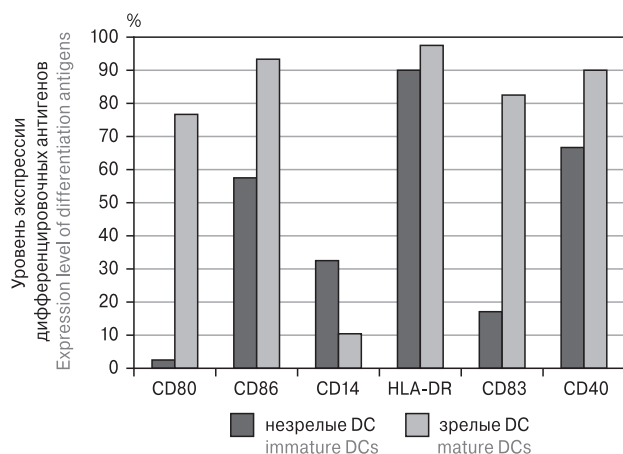


Рисунок 3. Фенотип дендритных клеток пациента с хроническим остеомиелитом

Figure 3. Phenotype of dendritic cells derived from an individual patient with chronic osteomyelitis

Суммируя данные о взаимодействии стафилококка и DC, Ву с соавт. (2014) отмечают, что DC играют сложную роль в инфекционных заболеваниях, вызванных золотистым стафилококком [33]. Авторы считают, что различные субпопуляции DC могут осуществлять различные иммунные реакции против инфекций, вызванных *S. aureus*, что может объяснять различные исходы заболеваний у пациентов, инфицированных *S. aureus*. В экспериментальных исследованиях показано, что истощение пула DC у CD11c-DTR-трансгенных мышей приводит к увеличению бактериальной нагрузки *S. aureus* в почках и легких, более высокому уровню смертности, более тяжелым воспалительным травмам и блокаде продукции IL-12. В то же время искусственное введение или незрелых, или LPS-созревших DC костномозгового происхождения в нормальных BALB/c мышей улучшило способность этих животных элиминировать бактерии *S. aureus* в легких [26].

В свою очередь *S. aureus* влияет на функции DC и может непосредственно убивать их, чтобы избежать иммунного клиренса. Dumont A.L. с соавт. показали, что стафилококковый цитотоксин — лейкоцидин A/B (LukAB) ответствен за цитотоксичность по отношению к DC моноцитарного происхождения. Хотя LukA и LukB по отдельности мало влияют на клеточную жизнеспособность, сочетание очищенного рекомбинантного LukA и LukB эффективно убивает DC [14]. Продемонстрировано, что тейхоевая кислота — гликополимер клеточной стенки грамположительных бактерий, важнейший компонент клеточной стенки *S. aureus*, имеет серьезное значение для индукции и созревания DC [17]. Факторы вирулентности

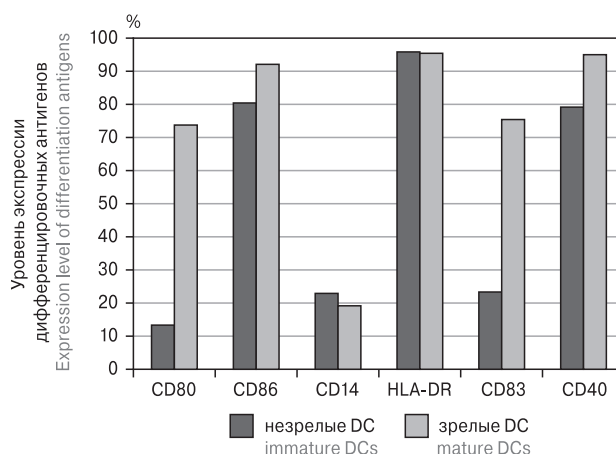


Рисунок 4. Фенотип дендритных клеток условно здорового донора

Figure 4. Phenotype of dendritic cells of a conditionally healthy donor

S. aureus активно модулируют производство цитокинов и процесс апоптоза, что, в свою очередь, указывает на возможную роль этих белков в модуляции DC опосредованного иммунитета *S. aureus* [13]. Например, у линейных мышей фенол-растворимые пептиды модулина (основного фактора метилен-резистентных штаммов *S. aureus*) непосредственно влияют на сигнальный путь p-38 CREB в DC, нарушая синтез цитокинов, и в результате повышая толерантность к патогену [9].

Таким образом, такие патогены как *S. aureus* имеют развитую тактику уклонения от иммунного клиренса, ослабляя активацию и функции DC. И хотя механизмы взаимодействия стафилококка с дендритными клетками еще окончательно не ясны, несомненно значение этой клеточной популяции для формирования иммунного ответа при стафилококковой инфекции.

В работе, проведенной нашими коллегами [6], показано, что у пациентов с остеомиелитом возрастает среднее содержание классических DC в крови с преобладанием незрелых DC, без сколь-либо значительного количества DC, созревших в очаге инфекции.

Полученные нами результаты демонстрируют способность DC, выделенных из моноцитов периферической крови пациентов с хроническим остеомиелитом, под влиянием активаторов *in vitro* дифференцироваться в зрелые DC, что выражается в статистически достоверном увеличении ассоциированных с созреванием молекул CD83, CD80, CD86 при снижении содержания CD14⁺ клеток. Аналогичные изменения отмечаются и при исследовании DC, выделенных из моноцитов периферической крови здоровых добровольцев. При этом изменение экспрессии антигена терминальной дифферен-

цировки CD83 и костимулирующей молекулы CD80 в процессе созревания у пациентов с хроническим остеомиелитом выражено значительно, чем у здоровых.

Преобладание незрелых клеток в крови пациентов с хроническим остеомиелитом, воз-

можно, играет роль в неадекватной реализации иммунного ответа при этой патологии и требует определенной коррекции, которая может быть основана на использовании созревания аутологичных ДС из мононуклеаров периферической крови пациентов *in vitro*.

Список литературы/References

1. Ключевский В.В., Сметанин С.М., Соловьев И.Н. Лечение открытых переломов бедренной кости // Гений ортопедии. 2012. № 1. С. 11–14. [Kliuchevsky V.V., Smetanin S.M., Soloviyov I.N. Treatment of open femoral fractures. *Genij Ortopedii*, 2012, no. 1, pp. 11–14. (In Russ.)]
2. Кузнецова А.В., Данилова Т.И., Гладских О.П., Иванов А.А., Пальцев М.А. Дендритные клетки и их использование в иммунотерапии // Молекулярная медицина. 2003. № 3. С. 3–17. [Kuznetsova A.V., Danilova T.I., Gladskikh O.P., Ivanov A.A., Paltsev M.A. Dendritic cells and their use in immunotherapy. *Molekulyarnaya meditsina = Molecular Medicine*, 2003, no. 3, pp. 3–17. (In Russ.)]
3. Пальцев М.А. Введение в молекулярную медицину. М.: Медицина, 2004. 496 с. [Paltsev M.A. Introduction to molecular medicine. *Moscow: Meditsina*, 2004. 496 p. (In Russ.)]
4. Пашенков М.В., Пинегин Б.В. Основные свойства дендритных клеток // Иммунология. 2001. № 4. С. 7–16. [Paschenkov M.V., Pinegin B.V. Basic properties of dendritic cells. *Immunologiya = Immunology*, 2001, no. 4, pp. 7–16. (In Russ.)]
5. Столяров Е.А., Батаков Е.А., Алексеев Д.Г., Батаков В.Е. Замещение остаточных костных полостей после некр-секвестрэктомии при хроническом остеомиелите // Гений ортопедии. 2009. № 4. С. 11–16. [Stoliarov E.A., Batakov E.A., Alekseyev D.G., Batakov V.E. Filling residual bone cavities after necrosectomy for chronic osteomyelitis. *Genij Ortopedii*, 2009, no. 4, pp. 11–16. (In Russ.)]
6. Талаев В.Ю., Талаева М.В., Лебедев М.Ю., Воронина Е.В., Живцов О.П., Заиченко И.Е., Бабайкина О.Н. Фенотипическая характеристика классических дендритных клеток крови и их субпопуляций в норме и при остеомиелите // Иммунология. 2017. Т. 38, № 4. С. 229–234. [Talayev V.Yu., Talaeva M.V., Lebedev M.Yu., Voronina E.V., Zhivtsov O.P., Zaichenko I.Ye., Babaykina O.N. Phenotypic characteristics of bloodborne classical dendritic cells and their subpopulations in norm and in osteomyelitis. *Immunologiya = Immunology*, 2017, vol. 38, no. 4, pp. 229–234. (In Russ.)]
7. Тевс Д.С., Калущкий П.В., Лазаренко В.А. Нарушения иммунного и цитокинового статуса у больных хроническим остеомиелитом костей стопы // Казанский медицинский журнал. 2013. Т. 94, № 4. С. 460–463. [Tevs D.S., Kalutsky P.V., Lazarenko V.A. Immune and cytokine disorders in patients with chronic foot osteomyelitis. *Kazanskiy meditsinskiy zhurnal = Kazan Medical Journal*, 2013, vol. 94, no. 4, pp. 460–463. (In Russ.)]
8. Чепелева М.В., Ключин Н.М. Иммунологические особенности хронического посттравматического остеомиелита // Травматология и ортопедия России. 2012. № 2. С. 67–70. [Chepeleva M.V., Klyushin N.M. Peculiar immunological properties of chronic posttraumatic osteomyelitis. *Travmatologiya i ortopediya Rossii = Traumatology and Orthopedics of Russia*, 2012, no. 2, pp. 67–70. doi: 10.21823/2311-2905-2012-2-67-70 (In Russ.)]
9. Armbruster N.S., Richardson J.R., Schreiner J., Klenk J., Günter M., Kretschmer D., Pöschel S., Schenke-Layland K., Kalbacher H., Clark K., Autenrieth S.E. PSM Peptides of *Staphylococcus aureus* activate the p38-CREB pathway in dendritic cells, thereby modulating cytokine production and T cell priming. *J. Immunol.*, 2016, vol. 196, pp. 1284–1292. doi: 10.4049/jimmunol.1502232
10. Bhattacharya R., Kundu B., Nandi S.K., Basu D. Systematic approach to treat chronic osteomyelitis through localized drug delivery system: bench to bed side. *Mater. Sci. Eng. C*, 2013, vol. 33, no. 7, pp. 3986–3993. doi: 10.1016/j.msec.2013.05.036
11. Bowen T.R., Widmaier J.C. Host classification predicts infection after open fracture. *Clin. Orthopaed. Rel. Res.*, 2005, vol. 433, pp. 205–211. doi: 10.1097/01.blo.0000150345.51508.74
12. Byun E.H., Kim W.S., Shin A.R., Kim J.S., Whang J., Won C.J., Choi Y., Kim S.Y., Koh W.J., Kim H.J., Shin S.J. Rv0315, a novel immunostimulatory antigen of *Mycobacterium tuberculosis*, activates dendritic cells and drives Th1 immune responses. *Mol. Med.*, 2012, vol. 90, pp. 285–298. doi: 10.1007/s00109-011-0819-2
13. Cruciani M., Etna M.P., Camilli R., Giacomini E., Percario Z.A., Severa M., Sandini S., Rizzo F., Brandi V., Balsamo G., Polticelli F., Affabris E., Pantosti A., Bagnoli F., Coccia E.M. *Staphylococcus aureus* Exs Factors Control Human Dendritic Cell Functions Conditioning Th1/Th17 Response. *Cell Infect. Microbiol.* 2017, vol. 21, no. 7, p. 330. doi: 10.3389/jcimb.2017.00330
14. Dumont A.L., Nygaard T.K., Watkins R.L., Smith A., Kozhaya L., Kreiswirth B.N., Shopsis B., Unutmaz D., Voyich J.M., Torres V.J. Characterization of a new cytotoxin that contributes to *Staphylococcus aureus* pathogenesis. *Mol. Microbiol.*, 2011, vol. 79, no. 3, pp. 814–825.
15. Etna M.P., Giacomini E., Severa M., Pardini M., Aguiló N., Martín C., Coccia E.M. A human dendritic cell-based *in vitro* model to assess *Mycobacterium tuberculosis* SO2 vaccine immunogenicity. *Altex*, 2014, vol. 31, no. 4, pp. 397–406. doi: 10.14573/altex.1311041
16. Filley A.C., Dey M. Neurooncol. Dendritic cell based vaccination strategy: an evolving paradigm. *J. Neuro-Oncol.*, 2017, vol. 133, no. 2, pp. 223–235. doi: 10.1007/s11060-017-2446-4
17. Hong S.J., Kim S.K., Ko E.B., Yun C.H., Han S.H. Wall teichoic acid is an essential component of *Staphylococcus aureus* for the induction of human dendritic cell maturation. *Mol. Immunol.*, 2017, vol. 81, pp. 135–142. doi: 10.1016/j.molimm.2016.12.008
18. Kinik H., Karaduman M. Cierny-Mader Type III chronic osteomyelitis: the results of patients treated with debridement, irrigation, vancomycin beads and systemic antibiotics. *Int. Orthop.*, 2008, vol. 32, no. 4, pp. 551–558. doi: 10.1007/s00264-007-0342-9

19. Kumar G., Roger P.M., Ticchioni M., Trojani C., Bernard de Dompsur R., Bronsard N., Carles M., Bernard E. T cells from chronic bone infection show reduced proliferation and a high proportion of CD28⁻ CD4⁺ T cells. *Clin. Exp. Immunol.*, 2014, vol. 176, no. 1, pp. 49–57. doi: 10.1111/cei.12245
20. Lin Y., Okada H. Cellular immunotherapy for malignant gliomas. *Expert. Opin. Biol. Ther.*, 2016, vol. 16, no. 10, pp. 1265–1275. doi: 10.1080/14712598.2016.1214266
21. McCormick S., Shaler C.R., Xing Z. Pulmonary mucosal dendritic cells in T-cell activation: implications for TB therapy. *Expert Rev. Respir. Med.*, 2011, vol. 5, no. 1, pp. 75–85. doi: 10.1586/ers.10.81
22. Naique S.B., Pearse M., Nanchahal J. Management of severe open tibial fractures. *J. Bone Joint Surg.*, 2006, vol. 88, pp. 351–357. doi: 10.1302/0301-620X.88B3.17120
23. Palucka K., Banchereau J. Cancer immunotherapy via dendritic cells. *Nat. Rev. Cancer*, 2012, vol. 12, no. 4, pp. 265–277. doi:10.1038/nrc3258
24. Romano E., Rossi M., Ratzinger G., de Cos M.-A., Chung D.J., Panageas K.S. Peptide-loaded Langerhans cells, despite increased IL15 secretion and T-cell activation in vitro, elicit antitumor T-cell responses comparable to peptide-loaded monocyte-derived dendritic cells in vivo. *Clin. Cancer Res.*, 2011, vol. 17, pp. 1984–1997. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-3421
25. Saliba H., Heurtault B., Bouharoun-Tayoun H., Flacher V., Frisch B., Fournel S., Chamat S. Enhancing tumor specific immune responses by transcutaneous vaccination. *Expert Rev. Vaccines*, 2017, vol. 16, no. 11, pp. 1079–1094. doi: 10.1080/14760584.2017.1382357
26. Schindler D., Gutierrez M.G., Beineke A., Rauter Y., Rohde M., Foster S., Goldmann O., Medina E. Dendritic cells are central coordinators of the host immune response to Staphylococcus aureus bloodstream infection. *Am. J. Pathol.*, 2012, vol. 181, no. 4, pp. 1327–1337. doi: 10.1016/j.ajpath.2012.06.039
27. Segura E. Review of mouse and human dendritic cell subsets. *Meth. Mol. Biol.*, 2016, vol. 1423, pp. 3–15. doi: 10.1007/978-1-4939-3606-9_1
28. Timmerman J.M., Czerwinski D.K., Davis T.A., Hsu F.J., Benike C., Hao Z.M., Taidi B., Rajapaksa R., Caspar C.B., Okada C.Y., van Beckhoven A., Liles T.M., Engleman E.G., Levy R. Idiotype-pulsed dendritic cell vaccination for B-cell lymphoma: clinical and immune responses in 35 patients. *Blood*, 2002, vol. 99, no. 5, pp. 1517–1526. doi: 10.1182/blood.V99.5.1517
29. Tong S.Y., Davis J.S., Eichenberger E., Holland T.L., Fowler V.G. Jr. Staphylococcus aureus infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2015, vol. 28, no. 3, pp. 603–661. doi: 10.1128/CMR.00134-14
30. Wagner C., Heck D., Lautenschläger K., Iking-Konert C., Heppert V., Wentzensen A., Hänsch G.M. T lymphocytes in implant-associated posttraumatic osteomyelitis: identification of cytotoxic T effector cells at the site of infection. *Shock*, 2006, vol. 25, no. 3, pp. 241–246. doi: 10.4061/2010/526740
31. Wagner J.M., Jaurich H., Wallner C., Abraham S., Becerikli M., Dadras M., Harati K., Duhan V., Khairnar V., Lehnhardt M., Behr B. Diminished bone regeneration after debridement of posttraumatic osteomyelitis is accompanied by altered cytokine levels, elevated B cell activity, and increased osteoclast activity. *J. Orthop. Res.*, 2017, vol. 35, no. 11, pp. 2425–2434. doi: 10.1002/jor.23555
32. Wang Y., Wang J., Meng J., Jiang H., Zhao J., Qian H., Chen T. Epigenetic modification mediates the increase of LAG-3⁺ T cells in chronic osteomyelitis. *Inflammation*, 2017, vol. 40, no. 2, pp. 414–421. doi: 10.1007/s10753-016-0486-0
33. Wu X., Xu F. Dendritic cells during Staphylococcus aureus infection: subsets and roles. *J. Transl. Med.*, 2014, vol. 12, pp. 358. doi: 10.1186/s12967-014-0358-z
34. Yu J.S., Liu G., Ying H., Yong W.H., Black K.L., Wheeler C.J. Vaccination with tumor lysate-pulsed dendritic cells elicits antigen-specific, cytotoxic T-cells in patients with malignant glioma. *Cancer Res.*, 2004, vol. 64, pp. 4973–4979. doi 10.1158/0008-5472.CAN-03-3505
35. Yu J.S., Wheeler C.J., Zeltzer P.M., Ying H., Finger D.N., Lee P.K., Yong W.H., Incardona F., Thompson R.C., Riedinger M.S., Zhang W., Prins R.M., Black K.L. Vaccination of malignant glioma patients with peptide-pulsed dendritic cells elicits systemic cytotoxicity and intracranial T-cell infiltration. *Cancer Res.*, 2001, vol. 61, no. 3, pp. 842–847. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-03-3505

Авторы:

Рубцова Ю.П., к.б.н., научный сотрудник группы биотехнологий ФГБОУ ВО Приволжский исследовательский медицинский университет МЗ РФ, Нижний Новгород, Россия;

Алейник Д.Я., к.м.н., старший научный сотрудник группы биотехнологий ФГБОУ ВО Приволжский исследовательский медицинский университет МЗ РФ, Нижний Новгород, Россия;

Живцов О.П., к.м.н., научный сотрудник отдела гнойной остеологии ФГБОУ ВО Приволжский исследовательский медицинский университет МЗ РФ, Нижний Новгород, Россия;

Митрофанов В.Н., к.м.н., старший научный сотрудник отдела гнойной остеологии ФГБОУ ВО Приволжский исследовательский медицинский университет МЗ РФ, Нижний Новгород, Россия.

Authors:

Rubtsova J.P., PhD (Biology), Researcher, Biotechnology Department, Privolzhsky Research Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation, Nizhny Novgorod, Russian Federation;

Aleynik D.Y., PhD (Medicine), Senior Researcher, Biotechnology Department, Privolzhsky Research Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation, Nizhny Novgorod, Russian Federation;

Zhivtsov O.P., PhD (Medicine), Researcher, Purulent Traumatology Department, Privolzhsky Research Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation, Nizhny Novgorod, Russian Federation;

Mitrofanov V.N., PhD (Medicine), Senior Researcher, Purulent Traumatology Department, Privolzhsky Research Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation, Nizhny Novgorod, Russian Federation.

Поступила в редакцию 04.04.2018
Отправлена на доработку 11.03.2019
Принята к печати 14.03.2019

Received 04.04.2018
Revision received 11.03.2019
Accepted 14.03.2019