

## БИОЛОГИЯ

УДК 612.017.1:616-001

### РАСТВОРИМЫЕ МОЛЕКУЛЫ ГИСТОСОВМЕСТИМОСТИ I И II КЛАССОВ В КРОВИ БОЛЬНЫХ С ТЯЖЕЛОЙ ЧЕРЕПНО-МОЗГОВОЙ ТРАВМОЙ

© 2010 г. С.В. Новикова<sup>1</sup>, Н.Б. Преснякова<sup>2</sup>, В.В. Королева<sup>2</sup>, В.В. Новиков<sup>1</sup>,  
М.Ю. Лебедев<sup>3</sup>, М.Н. Шолкина<sup>3</sup>, А.О. Трофимов<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Нижегородский госуниверситет им. Н.И. Лобачевского

<sup>2</sup>Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. И.Н. Блохиной

<sup>3</sup>Нижегородский НИИ травматологии и ортопедии

mbre@mail.ru

Поступила в редакцию 09.04.2010

Изложены результаты исследования сывороточного уровня sHLA-I и sHLA-DR, а также количества HLA-I<sup>+</sup> и HLA-DR<sup>+</sup> лимфоцитов периферической крови у пациентов с тяжелой черепно-мозговой травмой. Показано, что экспрессия HLA-I увеличена в ранний посттравматический период, а секреция sHLA-I – у впоследствии погибших больных. Экспрессия всех форм молекул HLA-DR снижена на всех стадиях обследования.

*Ключевые слова:* HLA I класса, HLA-DR, тяжелая черепно-мозговая травма.

#### Введение

Тяжесть состояния после тяжелой черепно-мозговой травмы (ЧМТ), высокая частота присоединения посттравматических инфекций во многом определяются состоянием иммунной системы организма пострадавшего [1, 2]. В связи с этим, все большее значение уделяется способам иммунотерапии, разработка которых возможна лишь на основании знания молекулярно-иммунологических аспектов тяжелой черепно-мозговой травмы. Известно, что молекулы гистосовместимости HLA I класса (sHLA-I) могут присутствовать в сыворотке крови и других биологических жидкостях в растворимой форме. Они образуются за счет протеолитического срезания мембранных форм молекул HLA I класса (mHLA-I) сериновыми протеазами [3]. Кроме этого, секреция растворимых молекул HLA-I может осуществляться путем альтернативного сплайсинга пре-мРНК [4, 5]. Установлено, что значительные количества sHLA-I секретируются активированными Т- и В-лимфоцитами как *in vitro*, так и *in vivo*. Естественным лигандом sHLA-I выступает молекула CD8.

Значимые изменения уровня sHLA-I в сыворотке крови происходят при самых различных заболеваниях. Описано повышение уровня sHLA-I при системной красной волчанке, у

больных с различными лимфомами, при ВИЧ-инфекции, поражениях печени различной этиологии, при раке желудка, лихорадочных состояниях, ревматоидных заболеваниях, при вирусных гепатитах В, С, G, при раке молочной железы на III и IV стадиях заболевания. Снижение уровня sHLA-I показано при одной из форм сифилиса. Известна прогностическая значимость уровня sHLA-I при тяжелых ожогах, вирусных гепатитах, трансплантациях различных органов [6, 7].

Растворимые формы одного из подклассов молекул гистосовместимости II класса – HLA-DR (sHLA-DR) определяются в виде гетеродимера в сыворотке крови и других биологических жидкостях, включая цереброспинальную и синовиальную жидкости [8–10]. Они образуются путем альтернативного сплайсинга пре-мРНК [11] или кливиджа (протеолитического срезания молекул с поверхности клеток) нейтральными сериновыми протеазами, в том числе HLE (человеческая лейкоцитарная эластаза) или катепсином G [12]. Известно, что растворимые молекулы HLA-DR способны существовать в межклеточном пространстве в виде стабильного комплекса с CD74 антигеном [13]. Другой способ существования растворимых молекул HLA-DR заключается в агрегации гетеродимеров между собой. Все фракции sHLA-DR в высоких концентрациях способны супрессировать Т-клеточный ответ [11].

Основными продуцентами растворимых форм молекул HLA-DR являются активированные антигенпрезентирующие клетки (дендритные клетки, моноциты, макрофаги, В-лимфоциты) и, в меньшей степени, активированные Т-хелперы, Т-цитотоксические лимфоциты, имеющие фенотип клеток памяти (CD45RO) [9, 14], а также NK-клетки. Естественным лигандом sHLA-DR выступает комплекс TCR-CD4 [15]. Значительные изменения содержания sHLA-DR в сыворотке крови происходят при самых различных заболеваниях. Описано повышение уровня sHLA-DR при злокачественных заболеваниях, рассеянном склерозе, HIV-инфекции, ревматоидном артрите и других аутоиммунных болезнях. Снижение содержания сывороточного уровня sHLA-DR антигенов обнаружено у больных, получивших механическую травму, осложненную последующим сепсисом [16], а также у больных с ожогами [7].

Задачи настоящей работы – исследование сывороточной концентрации растворимых молекул гистосовместимости I класса и растворимых форм HLA-DR, а также определение уровня экспрессии их мембранных аналогов на лимфоцитах периферической крови у пациентов с тяжелой черепно-мозговой травмой.

### Материалы и методы

Исследованы образцы крови 76 пациентов (68 мужчин и 8 женщин) с тяжелой черепно-мозговой травмой (по шкале Комы Глазго индекс тяжести состояния больных – до 8 баллов), лечившихся в Нижегородском межобластном нейрохирургическом центре больницы № 39. Возраст пациентов варьировал от 18 до 68 лет (в среднем – 43 года). Причинами травм явились: дорожно-транспортное происшествие – 39 (51.3%), падение с высоты – 7 (9.2%), побои – 21 (27.6%), бытовые повреждения – 4 (3.7%) и прочие неизвестные обстоятельства – 5 (7.6%). Сроки госпитализации составили от

одних суток до 35 дней. В зависимости от исходов черепно-мозговой травмы пациенты были разделены на две группы. В первую группу вошли 26 пострадавших, у которых тяжелая черепно-мозговая травма послужила причиной смерти, наступившей в сроки от 1 до 14 суток с момента получения травмы. Во вторую группу включены 50 пациентов, которые были выписаны на амбулаторное долечивание или переведены в неврологический стационар в удовлетворительном состоянии. В качестве контроля использовали образцы крови 35 клинически здоровых доноров. Средний возраст доноров составил 36 лет.

Молекулы гистосовместимости на поверхности лимфоцитов выявляли методом непрямой иммунофлюоресценции с помощью моноклональных антител ИКО-1 (против HLA-DR) и ИКО-53 (против альфа-цепи молекул HLA I класса). Содержание растворимых форм молекул гистосовместимости I класса в сыворотке крови пациентов изучали с помощью иммуноферментного анализа с использованием моноклональных антител ИКО-53 (против альфа-цепи молекул HLA I класса) и ИКО-216 (против  $\beta_2$ -микроглобулина) как описано ранее [6]. Содержание растворимых форм молекул HLA-DR в сыворотке крови исследовали с помощью иммуноферментного метода с применением моноклональных антител ИКО-1 и козьих поликлональных антител против поверхностных антигенов мононуклеарных клеток человека [17].

При статистическом анализе использовали программный пакет SPSS 14/0. Результаты выражали в виде  $M \pm m$ . При  $p < 0.05$  результаты считали достоверными.

### Результаты и их обсуждение

Обнаружено, что на фоне тяжелой черепно-мозговой травмы происходят значительные изменения экспрессии мембранных молекул HLA-DR и HLA I класса (табл. 1). Это выражается в

Таблица 1

Относительное содержание лимфоцитов периферической крови, экспрессирующих молекулы гистосовместимости (%)

Популяция лимфоцитов	Норма	Группы пациентов	Время после ЧМТ, сутки			
			1–3	4–7	8–14	15–21
HLA-I <sup>+</sup>	56.4±1.3	умерших	65.9±3.8*	44±3.3*	26.6±3.3*	–
		выживших	74.8±2.4*	63.5±3.6	56.8±3	54.0±2.6
HLA-DR <sup>+</sup>	37.9±2.4	умерших	16.4±2.8*	18.0±3.1*	14.1± 2.8*	–
		выживших	23.1± 2.0 <sup>***</sup>	21.5±1.6*	25.1±1.9 <sup>***</sup>	28.6±2.9*

\* Статистически достоверные различия в сравнении с нормой ( $p < 0.05$ ).

\*\* Статистически достоверные различия в сравнении с группами ( $p < 0.05$ ).

Таблица 2

**Содержание растворимых молекул HLA-I и HLA-DR в сыворотке крови больных с тяжелой черепно-мозговой травмой (ед/мл)**

Растворимая молекула	Здоровые доноры	Группы больных	Время после ЧМТ, сутки			
			1–3	4–7	8–14	15–21
sHLA-I	1032±36	умершие	2172±266 <sup>***</sup>	1411±262 <sup>*</sup>	2455±303 <sup>***</sup>	–
		выжившие	1516±170 <sup>*</sup>	1301±234	1279±133	1323±202
sHLA-DR	100±12	умершие	19±7 <sup>*</sup>	28±14 <sup>*</sup>	21±13 <sup>*</sup>	–
		выжившие	32±9 <sup>*</sup>	37±13 <sup>*</sup>	35±6 <sup>*</sup>	38±13 <sup>*</sup>

\* Статистически достоверные различия в сравнении с нормой ( $p < 0.05$ ).

\*\* Статистически достоверные различия в сравнении с группами ( $p < 0.05$ ).

снижении относительного и абсолютного числа клеток HLA-DR<sup>+</sup> как в группе погибших, так и в группе выживших пациентов. Имелись достоверные различия в содержании абсолютного количества лимфоцитов HLA-DR<sup>+</sup> в периферической крови погибших и выживших пострадавших ( $p < 0.05$ ).

Период первых трех суток от момента травмы вне зависимости от ее исхода характеризовался повышением относительного числа клеток HLA-I<sup>+</sup>. Однако уже с 4-х суток после черепно-мозговой травмы у впоследствии погибших относительное число лимфоцитов HLA-I<sup>+</sup> было достоверно ниже нормальных значений. В группе выживших пострадавших на протяжении второй и третьей недель после травмы определялась лишь тенденция к снижению относительного количества лимфоцитов HLA-I<sup>+</sup>.

Выявлены значительные изменения сывороточного содержания sHLA-I в зависимости от исхода и времени, прошедшего с момента травмы (табл. 2). В группе погибших пациентов с первых суток после тяжелой черепно-мозговой травмы определялось статистически достоверное повышение уровня молекул sHLA-I (210% по сравнению с донорской группой и 143% по сравнению с выжившими больными). На 4–7 сутки после травмы содержание sHLA-I имело тенденцию к повышению (137% по сравнению с нормальными величинами и 108% по сравнению с уровнем у выживших). На 8–14 сутки в сыворотке крови впоследствии погибших концентрация sHLA-I резко увеличивалась (238% по сравнению с донорами и 191% по сравнению с выжившими больными). У выживших пострадавших в период с 4-х по 21-е сутки определялась лишь тенденция к повышению сывороточной концентрации sHLA-I.

Начиная с первых суток после тяжелой черепно-мозговой травмы, наблюдалось досто-

верное снижение сывороточного уровня sHLA-DR в обеих группах пострадавших. В этот период содержание sHLA-DR в сыворотке крови впоследствии погибших составляло лишь 20% от уровня нормы, а у выживших – 32%. На 4–7 сутки от момента травмы уровень растворимых молекул HLA-DR был снижен в обеих группах пациентов (29% от нормы у впоследствии погибших и 37% у выживших соответственно). В период между 8 и 14 сутками после травмы у впоследствии погибших пациентов содержание sHLA-DR в сыворотке крови составляло 21% от уровня здоровых добровольцев. У выживших пациентов в течение второй и третьей недель наблюдения уровень sHLA-DR был также достоверно понижен и составлял 35% и 38% от нормы, соответственно. Полученные данные свидетельствуют о том, что тяжелая черепно-мозговая травма, независимо от ее исхода, приводит к значительному снижению как относительного количества лимфоцитов HLA-DR<sup>+</sup>, так и уровня растворимых молекул HLA-DR в сыворотке крови пациентов на протяжении всего периода наблюдения.

Таким образом, тяжелая черепно-мозговая травма приводит: 1) к достоверному повышению относительного количества лимфоцитов HLA-I<sup>+</sup> в раннем посттравматическом периоде, 2) повышению сывороточного уровня молекул sHLA-I у пациентов с неблагоприятным исходом; 3) к статистически достоверному снижению сывороточного содержания молекул sHLA-DR и относительного количества лимфоцитов HLA-DR<sup>+</sup> в обеих группах больных в течение всех периодов наблюдения.

*Список литературы*

1. Лисяной Н.И., Радзиевский А.А., Головкин О.Ю. ЧМТ как пусковой механизм формирования вторич-

ного иммунодефицита и возможность его коррекции // Нейрохирургия. Киев. 1990. № 23. С. 58–64.

2. Горбунов В.И. Автореферат дис. ...д-ра мед. наук. М.: ММА ин. им. И.Н. Сеченова, 2000. 38 с.

3. McDonald J.C., Adamashvili I. Soluble HLA: A review of the literature // Hum. Immunol. 1998. V. 59. P. 387–403.

4. Le J., Hua J.C. Production of soluble HLA-class-I molecules by IFN-gamma-induced colon-adenocarcinoma cells // Int. J. Cancer. 1995. V. 4. P. 576–581.

5. Mark L., Heaney D., Golde W. Soluble Cytokine Receptors // Blood. 1996. V. 87. № 3. P. 847–857.

6. Lebedev M.Yu., Krizhanova M.A., Vilkov S.A. et al. Peripheral blood lymphocytes immunophenotype and serum concentration of soluble HLA class I in burn patients // Burns. 2003. V. 29. P. 123–128.

7. Новиков В.В., Караулов А.В., Барышников А.Ю. Растворимые формы мембранных антигенов клеток иммунной системы. М.: Изд-во МИА, 2008. 249 с.

8. Hausmann S., Claus R., Buchwald S. et al. Quantitation of soluble HLA-DR antigens in human serum and other body fluids // Infusionsther Transfusionsmed. 1994. V. 32. P. 281–287.

9. Jendro M., Goronzy J.J., Weyand C.M. Structural and functional characterization of HLA-DR molecules circulating in the serum // Autoimmunity. 1991. V. 8. P. 289–296.

10. Aultman D., Adamashvili I., Yaturu K. et al. Soluble HLA in human body fluids // Hum. Immunol. 1999. V. 60. P. 239–244.

11. Claus R., Bittorf T., Walzel H. et al. High concentration of soluble HLA-DR in the synovial fluid: Rebmann V generation and significance in «rheumatoid-like» inflammatory joint diseases // Cell Immunol. 2000. V. 206. P. 85–100.

12. Seidl C., Lee J.S. Expression of alternatively spliced HLA class II transcripts in lymphoid and nonlymphoid tissues // Immunogenetics. 1992. V. 35. P. 385–390.

13. Rebmann V., Ugurel S., Tilgen W. et al. Soluble HLA-DR is a potent predictive indicator of disease progression in serum from early-stage melanoma patients // Cancer. 2002. V. 100. P. 580–585.

14. Мазуров Д.В., Мастерник Ю.А., Пинегин Б.В. Возрастные изменения Т-лимфоцитов человека, несущих маркеры CD45RO и HLA-DR // Иммунология. 2002. № 5. С. 268–271.

15. Claus R., Hausmann S., Zavazava N. et al. In vitro effects of solubilized HLA-DR-role in immunoregulation // Cell Immunol. 1994. V. 155. P. 476–485.

16. Ditschkowski M., Kreuzfelder E., Rebmann V. et al. HLA-DR expression and soluble HLA-DR levels in septic patients after trauma // Ann. Surg. 1999. V. 229. P. 246–254.

17. Худякова Н.Е., Мартынова Т.Г., Никитина И.А. и др. Разработка и апробация иммуноферментного метода определения растворимой формы молекул HLA-DR // Вестн. Нижегородского ун-та им. Н.И. Лобачевского. Сер. «Биология». 2001. № 1(5). С. 191–194.

#### SERUM LEVELS OF SOLUBLE HLA CLASS I AND HLA-DR IN PATIENTS WITH BRAIN INJURY

*S.V. Novikova, N.B. Presnyakova, V.V. Korolyova, V.V. Novikov,  
M.Yu. Lebedev, M.N. Sholkina, A.O. Trofimov*

Serum levels of sHLA-I and sHLA-DR has been determined by ELISA sandwich method in patients with severe traumatic brain injury and healthy volunteers. sHLA-I level was significantly increased in non-survivors during the whole period of their stay in the clinic and in survivors during the first 3 days compared to the volunteers. Simultaneously, a decrease in sHLA-DR level in the patients with severe traumatic brain injury versus volunteers was observed during the whole period of their stay in the clinic. The number of HLA-I<sup>+</sup> lymphocytes in all patients was significantly increased during the early posttraumatic period.

*Keywords:* HLA class I, HLA-DR, brain injury.