

## ЭКСПРЕССИЯ CD39 И CD73 НА ИНТЕРСТИЦИАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ ПРИ КАЛЬЦИНОЗЕ АОРТАЛЬНОГО КЛАПАНА

Головкин А. С., Жидулева Е. В., Шишкова А. А.,  
Семенова Д. С., Моисеева О. М., Малашичева А. Б.

Северо-западный федеральный медицинский исследовательский центр  
им. В. А. Алмазова, Санкт-Петербург, Россия

При изучении уровня экспрессии CD39 и CD73 на культурах интерстициальных клеток кальцинированных аортальных клапанов 31 пациента было установлено недостоверное ( $p=0,45$ ) увеличение CD39-CD73<sup>+</sup> в случае трикуспидального клапана (ТАК) по сравнению с двустворчатым клапаном (БАК). Клетки, выделенные из клапанов пациентов-женщин, имели достоверные различия фенотипа CD39-CD73<sup>+</sup> БАК – 23,67 (19,43;29,80)%, ТАК – 59,34 (49,17;69,55)% ( $p=0,002$ ). Полученные данные подтверждают участие пуриnergической регуляции в кальцификации аортального клапана, причем процесс этот, по-видимому, пол ассоциированный.

*Ключевые слова:* кальцинированный стеноз аортального клапана, интерстициальные клетки, пуриnergическая регуляция

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 16-34-60199).

В настоящее время предполагается, что внеклеточные нуклеотиды и рецепторы, участвующие в их метаболизме, играют активную роль в кальцификации клапанов сердца [1], а процесс этот связан, в первую очередь, с интерстициальными клетками [2].

Рецептор CD39 метаболизирует АТФ до АДФ, пирофосфата и АМФ. Последующее расщепление до аденозина и фосфата поверхностным осуществляется CD73. При этом пирофосфат оказывает ингибирующее влияние на процесс образования гидроксипатита, в то время как фосфат обладает стимулирующим эффектом [3]. Известно, что изменение активности этих рецепторов влияет на уровень внеклеточных нуклеотидов, что может приводить к поражению клапанного аппарата сердца [4].

Ранее при гистохимическом исследовании аортального клапана свиньи было показано, что CD39 и CD73 экспрессируются как на интерстициальных, так и на эндотелиальных клетках клапана [4]. Однако уровень спонтанной экспрессии CD39 и CD73 на культурах человеческих клеток, непосредственно участвующих в отложении кальциевых депозитов, в настоящее время еще не исследован.

**Цель.** Изучить уровень спонтанной экспрессии CD39 и CD73 на культурах интерстициальных клеток аортального клапана пациентов с тяжелым кальцинированным стенозом аортального клапана.

**Материал и методы.** В исследование был включен 31 пациент (21 мужчина и 10 женщин) с тяжелым аортальным стенозом, по поводу которого проводилось протезирование аортального клапана. У 14 пациентов был верифицирован врожденный порок сердца – двустворчатый аортальный клапан (БАК), у остальных – трехстворчатый (ТАК). Возраст пациентов в группе БАК составил 54 (47;62) года, ТАК – 61 (56;68) год ( $p=0,11$ ). Достоверных различий в эхокардиографических признаках тяжести стеноза у пациентов двух групп зафиксировано не было.

Из удаленных аортальных клапанов выделяли интерстициальные клетки путем ферментативного расщепления коллагеназой, клетки культивировали до конfluence. В дальнейшей работе использовали культуры клеток 2-4 пассажа. Окрашивание клеток выполняли антителами CD39 FITC (Biolegend) и CD73 PE (Beckton Dickenson). Фенотипирование выполняли на проточном лазерном цитометре Guava EasyCyte8. Обработку результатов, построение однопараметровых гистограмм и точеч-

ных графиков проводили в программе Kaluza v1.0 (Beckman Coulter). Рассчитывали среднюю интенсивность флюоресценции (MIF) CD39 и CD73 по сравнению с изотипическим контролем, а также процентные соотношения популяций клеток: CD39<sup>-</sup>CD73<sup>-</sup>, CD39<sup>-</sup>CD73<sup>+</sup>, CD39<sup>+</sup>CD73<sup>+</sup>, CD39<sup>-</sup>CD73<sup>-</sup>. Статистический анализ выполняли методом дисперсионного анализа (ANOVA) в программе Statistica 7.0. Результаты представлены в виде медианы и интерквартильного размаха Me (25;75). Достоверность различий оценивали с использованием непараметрического теста Манна-Уитни.

**Результаты.** Во всех наблюдения количество CD39<sup>+</sup> клеток не превышало 1%. MIF CD73 у клеток БАК составил 3,55 (2,07;6,35), у ТАК – 4,88 (3,62;6,34). Количество CD39<sup>-</sup>CD73<sup>-</sup> клеток БАК было 68,87 (33,92;80,56)%, и 49,24 (40,95;75,43)% – ТАК (p=0,36). Фенотип CD39<sup>-</sup>CD73<sup>+</sup> у БАК – 29,80 (18,31;65,53)%, у ТАК – 50,69 (23,70;58,73)% (p=0,45).

Поскольку в литературе имеются указания на возрастную и гендерную зависимость экспрессии пуриnergических регуляторов на Т-клетках иммунной системы, был проведен отдельный анализ экспрессии на клетках, выделенных от мужчин и от женщин. Достоверных различий в уровне экспрессии маркеров пуриnergической регуляции и субпопуляционном составе клеток, выделенных от мужчин и от женщин, выявлено не было. Вместе с тем, в случае изолированного сравнения уровня экспрессии рецепторов пуриnergической регуляции на интерстициальных клетках клапанов, полученных только от женщин, были выявлены достоверные различия. MIF CD73 у БАК составил 2,07 (1,92;3,55), у ТАК – 5,58 (4,78;6,67) (p=0,01). Дубль негативные клетки CD39<sup>-</sup>CD73<sup>-</sup> составляли 76,17 (68,87;80,56)% клеток БАК и 36,50 (27,99;46,79)% ТАК (p=0,001). Клеток с фенотипом CD39<sup>-</sup>CD73<sup>+</sup> БАК было 23,67 (19,43;29,80)%, ТАК – 59,34 (49,17;69,55)% (p=0,002).

**Обсуждение.** Ранее было показано, что у женщин в меньшей степени развивается кальцификация аортального клапана, но при этом имеет место более выраженная степень фиброза по сравнению с мужчинами [5]. В связи с этим представляется закономерным провести анализ экспрессии молекул, участвующих в пуриnergической регуляции, не только в зависимости от морфологии аортального клапана (двустворчатый/трехстворчатый), но

и оценить гендерные различия в экспрессии, как возможный механизм выявленных закономерностей процессов кальцификации.

На интерстициальных клетках трикуспидального аортального клапана уровень экспрессии CD73 был выше, чем на двустворчатом клапане. Равно как и процентное содержание CD39<sup>-</sup>CD73<sup>+</sup> клеток было выше. Однако достоверным это увеличение оказывалось лишь в случае проведения поправки на пол, т.е. на клетках, выделенных от пациентов-женщин.

В совокупности с низкой экспрессией CD39, который продуцирует протективный в отношении кальцификации пирофосфат, высокий уровень CD73 подтверждает участие интерстициальных клеток в отложении кальциевых депозитов, причем через пуриnergическую регуляцию, а не гидродинамические нарушения, присущие в первую очередь двустворчатому клапану. Важно отметить различия в уровне экспрессии CD73 (и CD39<sup>-</sup>CD73<sup>+</sup>) популяции на клетках, выделенных из двустворчатых и трехстворчатых клапанов. При этом в случае клеток, выделенных клапанов, полученных от женщин, различия были более выраженными и достоверными.

**Заключение.** Полученные данные подтверждают участие пуриnergической регуляции в кальцификации аортального клапана, причем процесс этот, по-видимому, пол ассоциированный.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Головкин А.С., Кудрявцев И.В., Серебрякова М.К. и др. Кальциноз аортального клапана: субпопуляционный состав циркулирующих Т-клеток и пуриnergическая регуляция. Российский иммунологический журнал. 2016; Т10(19) № 2(1):189-191.
2. Leopold JA. Cellular mechanisms of aortic valve calcification. *Circ Cardiovasc Interv.* 2012; 5(4): 605-614.
3. Fish R.S., Klootwijk E., Tam F.W.K., et al. ATP and arterial calcification. *Eur J Clin Invest.* 2013;43:405-412.
4. Kaniewska E., Sielicka A., Sarathchandra P., et al. Immunohistochemical and Functional Analysis of Ectonucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase 1 (CD39) and Ecto-5'-Nucleotidase (CD73) in Pig Aortic Valves. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids.* 2014;33(4-6):305-312.
5. Simard L., Côté N., Dagenais F., et al. Sex-Related Discordance Between Aortic Valve Calcification and Hemodynamic Severity of Aortic Stenosis: Is Valvular Fibrosis the Explanation? *Circ Res.* 2017; 120:681-691.

## CD39 AND CD73 EXPRESSION IN INTERSTITIAL CELLS OF CALCIFIED AORTIC STENOSIS

Golovkin A. S., Zhiduleva E. V., Shishkova A. A.,  
Semenova D. S., Moiseeva O. M., Malashicheva A. B.

Federal Almazov Medical Research Centre, St. Petersburg, Russia

Investigation of CD39 and CD73 expression on interstitial cells of calcified aortic valves of 31 patients was performed. Not significant increase ( $p=0,45$ ) of CD39<sup>-</sup>CD73<sup>+</sup> in cells from tricuspid aortic valves (TAV) comparing with bicuspid valves (BAV) was shown. Only from female patient's valves the difference became significant (BAV – 23,67 (19,43;29,80)%; TAV – 59,34 (49,17;69,55)% ( $p=0,002$ )). These data proves the hypotheses of purinergic signaling involvement in calcification suggesting that it is sex related process.

*Key words:* calcified aortic stenosis, interstitial cells, purinergic regulation

---

---

## РОЛЬ ГОМОСЕРИНЛАКТОНОВ В ВЫЖИВАЕМОСТИ САЛЬМОНЕЛЛ ПРИ ФАГОЦИТОЗЕ

Григорьева О. В., Каримов И. Ф.

ФГБОУ Оренбургский государственный университет,  
Оренбург, Россия

Описано повышение вирулентности сальмонелл в присутствии малых регуляторных молекул. Обнаружено влияние гомосеринлактонов, среди которых наибольшую роль играет N-(3-охо-гексаноил)-гомосеринлактон, на индукцию промотора *rck* у штамма *S. typhimurium* LT2, определяющего резистентность к системе комплемента. Выявлено повышение устойчивости штамма к фагоцитозу в присутствии гомосеринлактонов.

*Ключевые слова:* гомосеринлактон, сальмонеллы, чувство кворума, фагоцитоз

Наиболее развитой системой регуляции вирулентности бактерий, вероятно, является феномен кооперативной чувствительности, или *Quorum Sensing* (QS). В качестве молекул, обеспечивающих межклеточную и межвидовую коммуникацию выступают аутоиндукторы (АИ), среди которых наибольшую роль для грамотрицательных бактерий представляют гомосеринлактоны (ГСЛ) [1].

Некоторые виды бактерий, например, относящиеся к роду *Salmonella*, используют систему чувства кворума для выхода из-под удара комплемента. Однако, у сальмонелл наблюдается иная система QS, отличная от стандартной двухкомпонентной системы грамотрицательных бактерий. Сальмонеллы не продуцируют гомолог гена *LuxI*, однако кодируют гомолог *LuxR*, обозначаемый как *SdiA*, который способен обнаруживать и связывать ГСЛ, про-

изведенные другими видами бактерий. Таким образом, происходит активация генов островка патогенности SPI-1, в том числе гена резистентности системы комплемента (*rck*) [2].

С другой стороны, данные АИ способны оказывать самостоятельное действие на факторы иммунной системы, в частности описано ингибирование пролиферации Т-лимфоцитов и модуляция реакции В-клеток, а также индукция апоптоза макрофагов или нейтрофилов у мышей. Выявлено модифицирующее воздействие ГСЛ, продуцируемых *Pseudomonas aeruginosa*, на процессы хемотаксиса. Holm A. с соавторами обнаружили зависимость повышения фагоцитарной активности человеческих макрофагов от времени взаимодействия и концентрации ГСЛ произведенных *P. aeruginosa*. Помимо этого, известно, что ГСЛ может изменять выработку таких цитокинов