

АКТИВАЦИЯ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКА МОНОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПРИ ПАРОДОНТИТЕ

Теблосева Л.М.¹, Гусева О.А.², Филиппов С.В.³,
Хайдуков С.В.^{2,4}

¹ Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова, Москва, Россия

² ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева», Минздрава РФ, Москва, Россия

³ ФГБУ «Российская детская клиническая больница» Минздрава РФ, Москва, Россия

⁴ Технопарк, ФГБУН «Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Москва, Россия

Резюме. Пародонтит представляет собой хроническое инфекционное воспалительное заболевание, являющееся наиболее распространенной формой костной патологии у человека. *Porphyromonas gingivalis* часто встречается при поражении пародонта и считается основным этиологическим агентом пародонтита. Моноциты играют важную роль при развитии инфекционного процесса и последующем воспалении. Целью настоящего исследования было изучить изменение субпопуляционного состава моноцитов и взаимосвязь экспрессии CD14, CD16, CD45RA, HLA-DR антигенов на их поверхности при пародонтите.

Было показано, что течение пародонтита сопровождается увеличением количества провоспалительных моноцитов и характеризуется снижением экспрессии CD14 и появлением CD16. Кроме того наблюдалась активация моноцитов и этот факт отражает экспрессия CD45RA. Однако, хотя у пациентов с пародонтитом наблюдается значительное повышение количества CD14^{low}CD16⁺HLA-DR⁺ клеток, это не может играть существенную роль в развитии иммунного ответа и подавлении инфекции, вызвавшей пародонтит.

Ключевые слова: проточная цитометрия, моноциты, пародонтит, CD14, CD16

Адрес для переписки:

Хайдуков Сергей Валерьевич
д.б.н., заведующий лабораторией ФГБУ
«Федеральный научно-клинический
центр детской гематологии, онкологии
и иммунологии им. Дмитрия Рогачева»,
старший научный сотрудник ФГБУН
«Институт биоорганической химии
им. академиков М.М. Шемякина
и Ю.А. Овчинникова»
117997, Россия, Москва, ГСП-7,
ул. Миклухо-Маклая, 16/10.
Тел.: 8 (985) 923-41-62.
E-mail: khsergey54@mail.ru

Авторы:

Теблосева Л.М. — к.м.н., докторант кафедры
ФПДО, Московский государственный
медико-стоматологический университет
им. А.И. Евдокимова, Москва, Россия

Гусева О.А. — к.б.н., старший научный сотрудник,
лаборатория клеточной иммунологии ФГБУ
«Федеральный научно-клинический центр детской
гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия
Рогачева», Минздрава РФ, Москва, Россия

Филиппов С.В. — врач клинической лабораторной
диагностики ФГБУ «Российская детская клиническая
больница» Минздрава РФ, Москва, Россия

Хайдуков С.В. — д.б.н., заведующий лабораторией
ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр
детской гематологии, онкологии и иммунологии
им. Дмитрия Рогачева», старший научный сотрудник
ФГБУН «Институт биоорганической химии
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова»,
Москва, Россия

Поступила 05.06.2013

Принята к печати 01.08.2013

ACTIVATION AND DIFFERENTIATION OF PERIPHERAL BLOOD MONOCYTES IN PERIODONTITIS

Tebloeva L.M.^a, Guseva O.A.^b, Philippov S.V.^c,
Khaidukov S.V.^{b, d}

^a Moscow A.I. Evdokimov University of Medical Dentistry, Moscow, Russian Federation

^b Dmitry Rogachev Federal Research Clinical Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Ministry of Health Care, Moscow, Russian Federation

^c Russian Children's Clinical Hospital, Ministry of Health Care, Moscow, Russian Federation

^d M.M. Shemyakin and Yu.A. Ovchinnikov Institute of Bio-Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Abstract. Periodontitis is a chronic infectious inflammatory disease, being the most common bone disease in humans. *Porphyromonas gingivalis* bacteria are quite common in periodontal lesions, thus considered among major causal agents of periodontitis. Monocytes play a crucial role in development of the infectious events and subsequent inflammation. The aim of this study was to investigate appropriate changes of the monocyte subpopulations, as well as to assess relationships between expression of CD14, CD16, CD45RA, HLA-DR on the monocyte surfaces in the patients with periodontitis.

It was demonstrated that periodontitis is accompanied by increased counts of pro-inflammatory monocytes. These changes are characterized by decreased expression of CD14, along with occurrence of CD16 marker. Concomitant activation of the monocytes is reflected by CD45RA expression. However, in spite of significant increase in CD14^{low}CD16⁺HLA-DR⁺ cell counts observed in patients with periodontitis, these monocyte populations are not likely to play a significant role in development of a specific immune response and suppression of periodontitis. (*Med. Immunol.*, 2014, vol. 16, N 2, pp 165-172)

Keywords: flow cytometry, monocytes, periodontitis, CD14, CD16

Address for correspondence:

Khaidukov Sergey V.
PhD, MD, Head of Laboratory, Senior Research Associate, M.M. Shemyakin and Yu.A. Ovchinnikov Institute of Bio-Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences
117997, Russian Federation, Moscow, GSP-7, Miklukho-Maklaya str., 16/10.
Phone: 7 (985) 923-41-62.
E-mail: khsergey54@mail.ru

Authors:

Tebloeva L.M., PhD (Medicine), Doctoral Candidate, Faculty of Postgraduate Education, Moscow A.I. Evdokimov University of Medical Dentistry, Moscow, Russian Federation

Guseva O.A., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Cellular Immunology, Dmitry Rogachev Federal Research Clinical Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Ministry of Health Care, Moscow, Russian Federation

Philippov S.V., Medical Doctor (Clinical Laboratory Diagnostics), Russian Children's Clinical Hospital, Russian Ministry of Health Care, Moscow, Russian Federation

Khaidukov S.V., PhD, MD (Biology), Head of Laboratory, Senior Research Associate, M.M. Shemyakin and Yu.A. Ovchinnikov Institute of Bio-Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Received 05.06.2013

Accepted 01.08.2013

Введение

Заболевания пародонта (пародонтиты) отличаются гетерогенной этиологией, включают сложную по составу поддесневую биопленку, социальные и поведенческие аспекты, а также генетические особенности организма. *Porphyromonas gingivalis* (Pg) часто встречается при поражении пародонта и считается основным этиологическим агентом пародонтита [2]. В результате созревания и изменения биопленки, в основном за счет увеличения числа факультативных анаэробных грамотрицательных микроорганизмов [11], в пародонте происходят васкулярные изменения, сопряженные с экссудацией и миграцией фагоцитов, включая нейтрофилы, моноциты, макрофаги, в соединительный эпителий и десневую борозду, что приводит к первичному воспалению десневой ткани. В свою очередь моноциты играют важную роль при развитии инфекционного процесса и последующем воспалении. Одним из основных маркеров моноцитов является CD14 [14]. Существующие данные позволяют выделить две фенотипически различные субпопуляции моноцитов, имеющие различные характеристики рецепторов поверхности — CD14^{bright} и CD14^{low}. Эти субпопуляции различаются и по своим функциональным свойствам. Так, CD14^{low}CD16⁺ моноциты имеют более низкую продукцию TNF, IL-1 и IL-6 и включают в себя более зрелые клетки [13]. С другой стороны, активация мононуклеарных клеток периферической крови *in vitro* вызывает экспрессию CD45RA на моноцитах [4]. Таким образом, экспрессия CD45RA может быть использована в качестве маркера активации моноцитов *in vivo* [10], а исследование экспрессии CD45RA на моноцитах может помочь выявить активацию циркулирующих моноцитов при пародонтите. Подобная активация моноцитов может привести к образованию провоспалительных моноцитов [5] с последующей дифференцировкой в дендритные клетки [9]. В свою очередь наличие дендритных клеток является необходимым условием для развития иммунного ответа.

Целью настоящего исследования было изучить изменение субпопуляционного состава моноцитов и взаимосвязь экспрессии CD14, CD16, CD45RA, HLA-DR антигенов на их поверхности при пародонтите.

Материалы и методы

Исследование проводили на двух группах: условно здоровых донорах (контрольная груп-

па) и пациентах с пародонтитом. Группа условно здоровых доноров состояла из лиц в возрасте от 28 до 40 лет. Группа пациентов с пародонтитом состояла из 10 лиц в возрасте от 34 до 60 лет. Объектом исследования служила периферическая кровь.

Абсолютное и относительное количество моноцитов периферической крови проводили на гематологическом анализаторе UniCel® DxH™ 800 (Beckman Coulter, США).

В данном исследовании использовали следующую панель моноклональных антител, конъюгированных с различными флуорохромами: CD14-PE, CD16-PC5, CD45-FITC, CD45R0-ECD, CD45RA-PE, (HLA-DR)-ECD (все Beckman Coulter, США). Окраску клеток периферической крови человека для многоцветного анализа проводили в соответствии с рекомендациями производителя. Лизис эритроцитов проводили по безотмывочной технологии с использованием станции пробоподготовки TQ-Prep (Beckman Coulter, США). Протокол для цитофлюориметрического анализа с выбором зоны анализа для моноцитов по CD45 и морфологическим параметрам готовили, как описано в [1]. Анализ окрашенных клеток проводили на проточном цитофлюориметре Navios (Beckman Coulter, США). В каждой пробе анализировали не менее 5×10^3 моноцитов.

Математическую обработку данных проводили при помощи программы Kaluza v.1.2 (Beckman Coulter, США). Статистическую обработку данных проводили при помощи программного обеспечения Statistica 6.1 (StatSoft).

Результаты

Гематологический анализ периферической крови показал, что абсолютное и относительное содержание моноцитов в контрольной группе составляло $0,40 \pm 0,10 \times 10^9$ клеток/л и $7,65 \pm 1,10\%$. В свою очередь у пациентов с пародонтитом эти показатели составляли, соответственно, $0,18 \pm 0,05 \times 10^9$ клеток/л и $6,75 \pm 0,90\%$, что было несколько ниже, чем у контрольной группы, но укладывалось в диапазон допустимых значений для моноцитов.

Использование четырехцветной проточной цитофлюориметрии позволило проследить изменения субпопуляционного состава моноцитов у пациентов с пародонтитом и сравнить их с таковыми у условно здоровых доноров. Как видно из рисунка 1, у условно здоровых доноров количество провоспалительных моноцитов

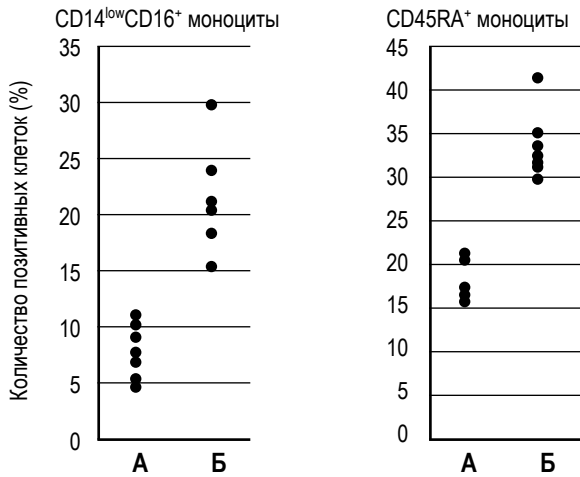


Рисунок 1. Изменение количества позитивных CD14^{low}CD16⁺ и CD45RA⁺ моноцитов у пациентов с пародонтитом (Б) по сравнению с контрольной группой (А)

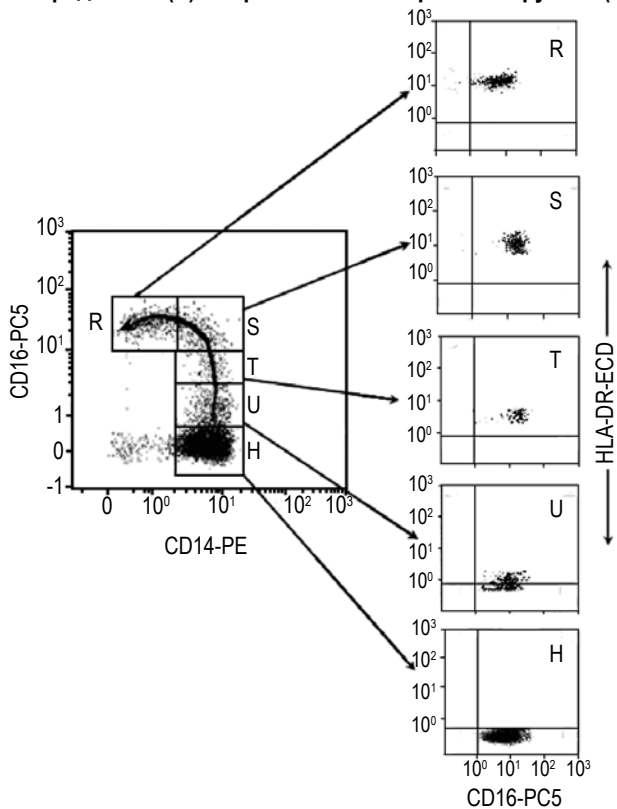


Рисунок 2. Алгоритм для определения направления дифференцировки CD14^{bright} моноцитов в CD14^{low}CD16⁺HLA-DR⁺ дендритные клетки

(CD14^{low}CD16⁺) составляло $8,06 \pm 2,50\%$ от всех моноцитов. Тогда как у пациентов с пародонтитом оно возрастало до $21,36 \pm 6,70\%$. Аналогичная картина наблюдалась и в случае анализа экспрессии CD45RA на моноцитах в тех же группах — $17,86 \pm 2,20\%$ и $33,82 \pm 4,5\%$ соответственно.

Анализ направления дифференцировки провоспалительных моноцитов был осуществлен по следующему разработанному алгоритму. После получения результатов их подвергали математической обработке в программе Kaluza v. 1.2, используя алгоритм, изображенный на рисунке 2. В гистограмму распределения CD14 против CD16 вводили 5 дополнительных зон (рис. 2, зоны H, U, T, S, R) и создавали 5 отдельных дополнительных гистограмм распределения CD16 против HLA-DR. В каждую из дополнительных гистограмм вводили логическое ограничение исключительно по одной из созданных зон. В данных гистограммах определяли медиану интенсивности флуоресценции (MFI), отражающую плотность экспрессии исследуемых антигенов. Результаты представлены в таблице 1. Полученные данные свидетельствуют о том, что дифференцировка CD14^{bright} моноцитов в CD14^{low}CD16⁺HLA-DR⁺ протекает двумя параллельными путями. Так, в случае CD14 и CD16 первоначально идет только медленное возрастание экспрессии CD16, а затем резкое уменьшение экспрессии CD14 с возрастанием экспрессии CD16. Параллельно с возрастанием экспрессии CD16 возрастает и количество HLA-DR. Однако при достижении максимума экспрессии CD16 начинается резкое снижение экспрессии HLA-DR, но не CD16 (рис. 3А, Б).

Обсуждение

Для инициации адаптивного иммунного ответа одним из важнейших шагов является активация наивных Т-клеток за счет профессиональных антиген-представляющих клеток. В свою очередь эта активация Т-клеток приводит к пролифера-

ТАБЛИЦА 1. ИЗМЕНЕНИЕ MFI CD14, CD16 И HLA-DR ПРИ ДИФФЕРЕНЦИРОВКЕ ПРОВСПАЛИТЕЛЬНЫХ МОНОЦИТОВ

Маркеры моноцитов	MFI в зонах анализа клеток									
	Зона H		Зона U		Зона T		Зона S		Зона R	
	Контроль	Пародонтит	Контроль	Пародонтит	Контроль	Пародонтит	Контроль	Пародонтит	Контроль	Пародонтит
CD14	17,4±1,9	15,7±5,4	18,5±2,1	16,8±5,4	14,9±2,5	16,0±5,8	9,3±0,9	10,3±2,2	2,2±0,5	2,0±0,6
CD16	0,12±0,04	0,12±0,08	0,6±0,05	0,6±0,13	3,0±0,2	2,9±0,2	11,3±2,7	12,6±2,3	14,4±5,4	18,9±4,5
HLA-DR	5,8±1,3	6,2±3,2	10,1±3,8	9,8±3,9	21,8±4,6	15,8±6,9	18,6±3,7	15,5±7,1	10,5±3,6	8,0±4,2

Примечание. Зоны анализа представлены на рисунке 2.

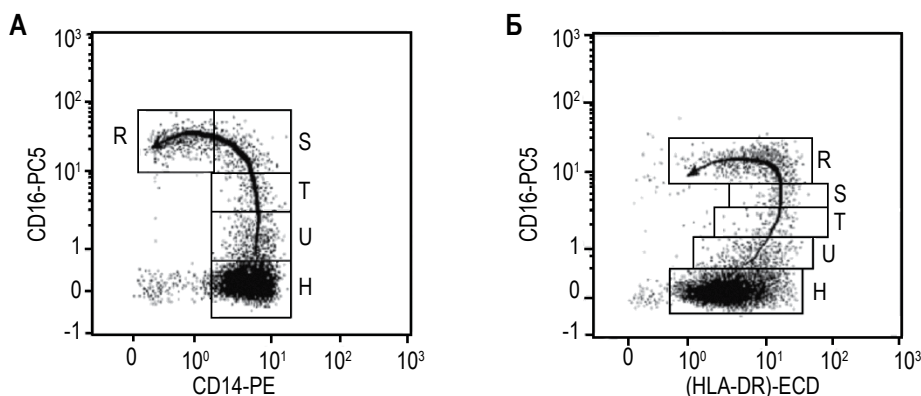


Рисунок 3. Дифференцировка CD14^{bright} моноцитов в CD14^{low}CD16⁺HLA-DR⁺ дендритные клетки

Примечание. Стрелки показывают направление дифференцировки.

ции и дифференцировке их потомства в эффекторные Т-клетки. В состав профессиональных антиген-представляющих клеток включают моноциты/макрофаги и дендритные клетки. При развитии противоинфекционного иммунного ответа каждая из этих популяций имеет свои собственные, присущие только ей функции. Макрофаги эффективно поглощают корпускулярные антигены, что вызывает у них повышение экспрессии антигенов главного комплекса гистосовместимости класса II (HLA-DR) и усиливает их ко-стимулирующую активность. Дендритные клетки конститутивно экспрессируют молекулы главного комплекса гистосовместимости класса II и обладают ко-стимулирующей активностью. Они могут захватывать антиген в процессе макропиноцитоза и обладают способностью специализированно представлять патогены, которые не вызывают активацию моноцитов/макрофагов.

Моноциты играют одну из ключевых ролей при различных инфекциях и последующем воспалении. В зависимости от фенотипа и функций данная популяция клеток изначально была разделена на две основные субпопуляции, а именно на CD14^{bright}CD16⁻ и CD14^{low}CD16⁺. Субпопуляция моноцитов, экспрессирующая CD14^{low}CD16⁺, была названа провоспалительной, за счет более высокой секреции провоспалительных цитокинов. Так, наблюдалось значительное повышение продукции TNF и IL-12 при снижении продукции IL-1 и IL-10 [16]. Как правило, большинство моноцитов не содержат на своей мембране CD16, но экспрессируют высокий уровень CD14. Однако CD14^{low}CD16⁺ моноциты составляют до 10% от всех моноцитов у здоровых взрослых индивидов [15], а при воспалительных заболеваниях, на-

пример при сепсисе [7], их доля может возрастать до 40%.

Описанные в литературе исследования эффектов липополисахаридов, полученных из *Porphyromonas gingivalis* (ЛПС P_g), на периферические моноциты человека показали, что в присутствии IL-4, GM-CSF и ЛПС P_g моноциты изменяли экспрессию CD14 и CD16. Следует отметить, что ЛПС P_g преимущественно индуцировал секрецию растворимой формы CD14, но вызывал экспрессию CD16 на мембране моноцитов. В данном исследовании также наблюдалось значительное увеличение количества CD14^{low}CD16⁺ моноцитов у пациентов с пародонтитом по сравнению с контрольной группой (рис. 1).

Помимо CD14 и CD16 моноциты экспрессируют CD45, представляющий собой гликопротеин клеточной поверхности, обладающий тирозинфосфатазной активностью. Изоформы CD45, экспрессируемые на ограниченной группе клеток, получили наименование CD45R. CD45RA является самой высокомолекулярной изоформой и имеет молекулярную массу 220 kD [12]. Напротив, изоформа CD45R0 имеет самую низкую молекулярную массу (180 kD), но именно она в основном экспрессируется на моноцитах периферической крови [8]. Имеются данные, что активация мононуклеарных клеток периферической крови *in vitro* сопровождается повышением экспрессии CD45RA на моноцитах [4]. Таким образом, экспрессия CD45RA может быть использована в качестве маркера активации моноцитов *in vivo* [10], а исследование экспрессии CD45RA на моноцитах может помочь выявить активацию циркулирующих моноцитов при пародонтите.

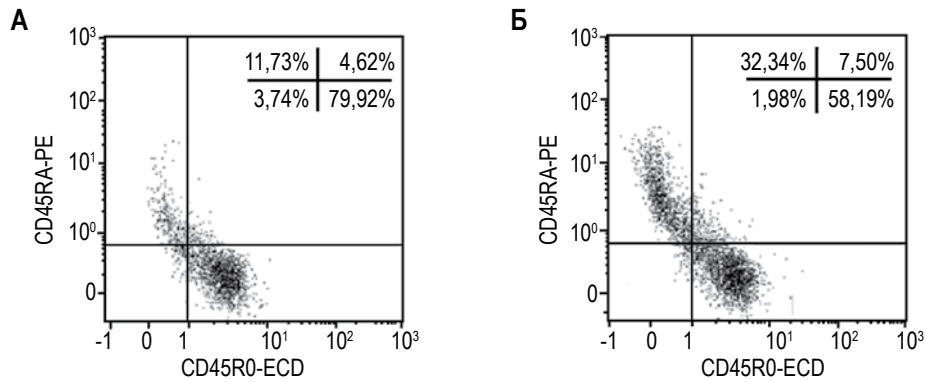


Рисунок 4. Изменение экспрессии CD45R0 и CD45RA на моноцитах периферической крови у условно здорового донора (А) и у пациента с пародонтитом (Б)

Примечание. Приведены гистограммы одного из типичных экспериментов.

Проведенный в данном исследовании анализ экспрессии CD45RA, ассоциированной с активацией моноцитов, выявил повышение ее у всех пациентов с пародонтитом (рис. 1 и рис. 4Б) по сравнению с контрольной группой (рис. 1 и рис. 4А), а доли CD14^{low}CD16⁺ моноцитов и CD45RA⁺ моноцитов были сопоставимы. Эти данные позволяют предположить, что CD45RA⁺ моноциты представляют собой активированную субпопуляцию CD14^{low}CD16⁺ моноцитов.

В свою очередь для реализации эффекторных функций Т-хелперов необходимо их взаимодействие с профессиональными, представляющими антиген клетками, такими как дендритные клетки [6]. По сравнению с CD14^{bright} моноцитами, субпопуляция CD14^{low}CD16⁺ может дифференцироваться в дендритные клетки (ДК), которые продуцируют меньшее количество цитокинов, но имеют более высокую фагоцитарную и окислительную активность [3, 9]. Одним из маркеров ДК являются антигены главного комплекса гистосовместимости класса II – HLA-DR антигены.

Анализ экспрессии HLA-DR антигенов на CD14^{low}CD16⁺ моноцитах показал, что возрастание количества CD14^{low}CD16⁺ моноцитов у пациентов с пародонтитом сопровождалось повышением экспрессии HLA-DR антигенов теми же самыми клетками (рис. 4). Правомерно было ожидать усиления презентации антигена и активного развития иммунного ответа, но у исследуемых пациентов этого не происходило.

Аналогичные результаты были получены при стимулировании ДК LPS Pg, бактерии, которая считается основным этиологическим агентом пародонтита. Хотя LPS Pg вызывал повышение

экспрессии HLA-DR, но это не повышало способность этих клеток к презентации антигенов. Эти ДК были способны к презентации антигена, но не в состоянии эффективно стимулировать Т-клетки из-за отсутствия стимулирующих молекул. Существующие данные об ограниченной возможности Pg LPS-стимулированных ДК к индукции аллогенного Т-клеточного ответа также подтверждают данный факт. Кроме того, слабая продукция цитокинов при стимуляции Pg LPS также может быть ответственна за это, поскольку цитокины играют важную роль в способности ДК инициировать иммунный ответ [3]. Это несоответствие может быть частично объяснено слабой экспрессией костимулирующих молекул. Так, из таблицы 1 видно, что плотность экспрессии HLA-DR на CD14^{low}CD16⁺ моноцитах от пациентов с пародонтитом ниже, чем такие же клетки у условно здоровых доноров. Причем изменения плотности экспрессии CD14 и CD16 при дифференцировке моноцитов из CD14^{bright} в CD14^{low} сопоставимы.

Все приведенное выше позволяет предположить, что LPS Pg нарушает полное созревание ДК, хотя индуцирует образование CD14^{low}CD16⁺ субпопуляции. Эта уникальная способность LPS Pg может объяснить способность *Porphyromonas gingivalis* уклоняться от иммунной системы [9]. Возможно, ДК, происходящие из CD14^{low}CD16⁺ моноцитов, способствуют сохранению хронического воспаления при пародонтите, так как они не могут эффективно координировать антибактериальную защиту. Это наводит на мысль, что в течение пародонтопатогенной бактериальной инфекции происходит раннее образование

CD14^{low}CD16⁺ предшественников дендритных клеток, которые, в конечном счете, не в состоянии очистить пародонт от инфекции.

Таким образом, течение пародонтита сопровождается увеличением количества провоспалительных моноцитов, характеризующееся снижением экспрессии CD14 и появлением CD16 с последующим повышением экспрессии этой молекулы. Кроме этого, наблюдается активация

моноцитов, что отражается в экспрессии CD45RA на их поверхности. Однако, хотя у пациентов с пародонтитом наблюдается значительное повышение количества CD14^{low}CD16⁺HLA-DR⁺ моноцитов, это не может играть существенную роль в развитии иммунного ответа. Данный факт может частично объяснить, почему не происходит подавление инфекции, вызвавшей пародонтит.

Список литературы

1. Хайдуков С.В., Байдун Л.А., Зурочка А.В., Тотолян Арег А. Стандартизованная технология «исследование субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови с применением точных цитофлуориметров-анализаторов» (проект) // Медицинская иммунология. – 2012. – Т. 14, № 3. – С. 255-268.
2. Чухловин А.Б., Соловьева А.М., Матело С.К., Кобиясова И.В., Морозова Е.Б., Хохлачева А.В., Тепляков Б.Г., Сысоев К.А., Константинова В.Е., Матело Л.Н., Тотолян А.А. Микробные маркеры заболеваний пародонта и их практическая значимость в стоматологии // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2007. – Т. 144, № 10. – С. 427-431.

Ссылки 3-16 см. в References (сmp. 171-172). See References for numbers 3-16 at pp. 171-172.

References

1. Khaidukov S.V., Baydun L.A., Zurochka A.V., Totolian Areg A. Standartizovannaya tekhnologiya «Issledovanie subpopulyatsionnogo sostava limfotsitov perifericheskoy krovi s primeneniem protochnykh tsitoflyuorimetrov-analizatorov» (Proekt) [A standardized technology «research subpopulation of lymphocytes in peripheral blood using flow cytometry analyzers» (The project)]. *Meditinskaya immunologiya – Medical Immunology*, 2012, vol. 14(3), pp. 255-268.
2. Chukhlovina A.B., Solov'eva A.M., Matelo S.K., Kobiyasova I.V., Morozova E.B., Hokhlacheva A.V., Teplyakov B.G., Sysoev K.A., Konstantinova V.E., Matelo L.N., Totolian A.A. Mikrobnye markery zabolevaniy parodonta i ikh prakticheskaya znachimost' v stomatologii [Bacterial markers of periodontal diseases and their practical significance in dentistry]. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny – Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. – 2007. – Vol. 144(10), – P. 427-431
3. Almeida J., Bueno C., Alguer M.C., Sanchez M.L., de Santiago M. Comparative analysis of the morphological, cytochemical, immunophenotypical, and functional characteristics of normal human peripheral blood lineage (-)/CD16(+)/HLA-DR(+)/CD14(-/lo) cells, CD14(+) monocytes, and CD16(-) dendritic cells. *Clin. Immunol.*, 2001, vol. 100, no. 3, pp. 325-338.
4. Brohee D., Higuier N. *In vitro* stimulation of peripheral blood mononuclear cells by phytohaemagglutinin A induces CD45RA expression on monocytes. *Cytobios.*, 1992, vol. 71, pp. 105-111.
5. Buduneli N., Bcakci N., Keskinoglu A. Flow-cytometric analysis of lymphocyte subsets and mCD14 expression in patients with various periodontitis categories. *J. Clin. Periodontol.*, 2001, vol. 28, pp. 419-424.
6. Fearon D.T., Locksley R.M. The instructive role of innate immunity in the acquired immune responses. *Science*, 1996, vol. 272, pp. 50-54.
7. Fingerle G., Pforte A., Passlick B., Blumenstein M., Strobel M., Ziegler-Heitbrock H.W. The novel subset of CD14⁺/CD16⁺ blood monocytes expanded in sepsis patients. *Blood*, 1993, vol. 82, pp. 3170-3176.
8. Gabriel H., Urhausen A., Brechtel L., Müller H.J., Kindermann W. Alterations of regular and mature monocytes are distinct, and dependent of intensity and duration of exercise. *Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol.*, 1994, vol. 69, no. 2, pp. 179-181.

9. Kanaya S., Nemoto E., Ogawa T., Shimauchi H. *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharides induce maturation of dendritic cells with CD14⁺CD16⁺ phenotype. *Eur. J. Immunol.*, 2004, vol. 34, pp. 1451-1460.
10. Rothe G., Gabriel H., Kovacs E., Klucken J., Stöhr J., Kindermann W., Schmitz G. Peripheral blood mononuclear phagocyte subpopulations as cellular markers in hypercholesterolemia. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 1996, vol. 16, pp. 1437-1447.
11. Taubman M.A., Kawai T. Involvement of T-lymphocytes in periodontal disease and in direct and indirect induction of bone resorption. *Crit. Rev. Oral. Biol. Med.*, 2001, vol. 12, pp. 125-135.
12. Wood G.S., Freudenthal P.S., Edinger A., Steinman R.M., Warnke R.A. CD45 epitope mapping of human CD1a⁺ dendritic cells and peripheral blood dendritic cells. *Am. J. Pathol.*, 1991, vol. 138(6), pp. 1451-1459.
13. Ziegler-Heitbrock H.W.L., Strobel M., Kieper D., Fingerle G., Schlunck T., Petersmann I., Ellwart J., Blumenstein M., Haas J.G. Differential expression of cytokines in human blood monocytes. *Blood*, 1992, vol. 79, pp. 503-511.
14. Ziegler-Heitbrock H.W.L., Ulevitch R.J. CD14: Cell surface receptor and differentiation marker. *Immunol. Today*, 1993, vol. 14, pp. 121-125.
15. Ziegler-Heitbrock H.W.L. Heterogeneity of human blood monocytes: the CD14⁺CD16⁺ subpopulation. *Immunol. Today*, 1996, vol. 17, pp. 424-428.
16. Ziegler-Heitbrock H.W.L. The CD14⁺CD16⁺ blood monocytes: their role in infection and inflammation. *J. Leukoc. Biol.*, 2007, vol. 81, pp. 584-592.