

ФЕНОТИПИЧЕСКИЙ ПРОФИЛЬ CD64⁻CD16⁺CD32⁺CD11b⁺, CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺ СУБПОПУЛЯЦИЙ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ У ЗДОРОВЫХ НОВОРОЖДЕННЫХ, УСЛОВНО-ЗДОРОВЫХ ДЕТЕЙ РАЗЛИЧНЫХ ВОЗРАСТНЫХ ГРУПП И УСЛОВНО- ЗДОРОВЫХ ВЗРОСЛЫХ СУБЪЕКТОВ

© 2019 г. Г.А. Чудилова^{1*}, И. В. Нестерова^{1,2}

*E-mail: chudilova2015@yandex.ru

¹ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет Минздрава России»,
отдел клинической и экспериментальной иммунологии и молекулярной биологии ЦНИЛ,
Краснодар, Россия;

²ФГАБОУ ВО «Российский университет дружбы народов» Министерства образования
и науки России, кафедра аллергологии и иммунологии, Москва, Россия

Поступила: 11.01.2019. Принята: 30.01.2019

Нейтрофильные гранулоциты (НГ) с различной рецепторной оснащенностью, представляют собой гетерогенные субпопуляции отличающиеся по своим биологическим свойствам и роли в патогенезе иммунозависимых заболеваний. В результате исследований нами получены новые данные о фенотипических особенностях субпопуляций НГ, несущих молекулы CD64, CD32, CD16 и CD11b, характерных для новорожденных и детей по сравнению с группой условно-здоровых взрослых субъектов. Установлено, что в периферической крови здоровых доношенных новорожденных, условно-здоровых детей разных возрастных групп и взрослых циркулируют две основные субпопуляции НГ — мажорная с фенотипом CD64⁻CD16⁺CD32⁺CD11b⁺ и минорная CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺ с разной плотностью экспрессии рецепторов. Показано, что для каждой из исследуемых групп характерен свой фенотипический профиль, возможно оптимальный, для выполнения НГ эффекторных функций. Так у новорожденных определены субпопуляции с фенотипами CD64⁻CD16^{dim}CD32^{dim}CD11b^{bright}НГ и CD64^{dim}CD16^{mid}CD32^{bright}CD11b^{bright}НГ; у детей 2—4 лет CD64⁻CD16^{bright}CD32^{dim}CD11b^{bright}НГ и CD64^{mid}CD16^{bright}CD32^{dim}CD11b^{bright}НГ; у детей 5—9 лет CD64⁻CD16^{mid}CD32^{dim}CD11b^{dim}НГ и CD64^{dim}CD16^{bright}CD32^{mid}CD11b^{dim}НГ и у группы здоровых взрослых CD64⁻CD16^{mid}CD32^{dim}CD11b^{bright}НГ и CD64^{bright}CD16^{dim}CD32^{mid}CD11b^{dim}НГ. Установлено, что НГ новорожденных и детей разных возрастных групп имеют схожую плотность экспрессии рецепторов CD64, CD16, CD32, CD11b на мажорной и минорной субпопуляциях, в то время как субпопуляции НГ здоровых взрослых оснащены по-разному. Изучение рецепторов при физиологических состояниях с учетом возрастных особенностей, необходимо для правильной интерпретации трансформации фенотипа, изменения поверхностной экспрессии при различных патологических состояниях.

Ключевые слова: нейтрофильные гранулоциты, фенотип, субпопуляции

DOI: 10.31857/S102872210005021-8

Адрес: 350061, г. Краснодар, ул.Благодеева, д. 14, кв.11, Чудилова Галина Анатольевна.Тел.: 89184102214 (моб).

E-mail: chudilova2015@yandex.ru

Авторы:

Чудилова Г.А., к.б.н., доцент, заведующая отделом клинической и экспериментальной иммунологии и молекулярной биологии ЦНИЛ ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет Минздрава России», г. Краснодар, Россия;

Нестерова И.В., д.м.н., профессор, профессор кафедры аллергологии и иммунологии ФГАБОУ ВО «Российский уни-

верситет дружбы народов» Министерства образования и науки России, г. Москва, Россия; главный научный сотрудник отдела клинической и экспериментальной иммунологии и молекулярной биологии ЦНИЛ ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет Минздрава России», г. Краснодар, Россия.

ВВЕДЕНИЕ

Гетерогенность нейтрофильных гранулоцитов (НГ), наличие субпопуляций с широким спек-

тром фенотипов и, соответственно, с разными функциями, в настоящее время не вызывают сомнения. Регулирование функций НГ может происходить за счет факторов микроэкологической модуляции, которые влияют на фенотип и функции зрелых клеток, а также изменяют дифференцировку и / или созревание клеток [1–5].

НГ в циркулирующей крови находятся в состоянии покоя, характеризуются минимальной транскрипционной активностью и ограниченной способностью реагировать на активирующие раздражители. При воздействии праймирующих агентов НГ, обладая необычайной пластичностью, быстро подвергаются активации (синтезу цитокинов, медиаторов и ферментов, экспрессии рецепторов), которые опосредуют последующие фенотипические и функциональные изменения, необходимые для осуществления адекватного иммунного ответа. В последнее время растет интерес к исследованию поверхностных антигенов, изучению и идентификации функционально-значимых рецепторов, что имеет большое значение для углубленного анализа как гетерогенных субпопуляций НГ, так и установление их роли в патогенезе иммунозависимых заболеваний.

С этой точки зрения, огромный интерес представляют Fcγ – (CD64, CD32, CD16) и CD11b рецепторы. Активация этих рецепторов приводит к сложным процессам клеточной активации и элиминации, таким как фагоцитоз, экзоцитоз внутриклеточных гранул, продуцирование активных форм кислорода (ROS), антителозависимая клеточная цитотоксичность (АЗКЦ), высвобождение внеклеточных ловушек НГ (NETs), а также дополнительные ответы, такие как хемотаксическая миграция или выделение хемокинов и цитокинов [6, 7]. Так, низкоаффинные CD16(FcγRIII), CD32(FcγRII) играют важную роль во взаимодействии НГ с иммунными комплексами [8]. FcγRIIIB осуществляют начальный контакт и связывание иммунных комплексов *in vivo* [9], затем происходит полная активация НГ посредством синергического лигирования как FcγRIIA, так и FcγRIIIB, чтобы получить полное ингибирование ответов НГ необходимо удалить или заблокировать оба рецептора [10]. Высокоаффинный рецептор CD64 (FcγRI), способен связывать IgG1, IgG3 и IgG4 в мономерной форме, на ранних стадиях гранулопоэза, а на зрелых НГ условно здоровых субъектов он представлен на очень низком уровне (~1400 рецепторов на клетку). Экспрессия на поверхности НГ индуцируется в ответ на ком-

поненты микробной стенки (LPS), компоненты комплемента и некоторые цитокины (IFNγ, TNFα, IL8, IL12), которые сопровождают развитие бактериальных инфекций [11, 12].

CD11b (рецептор комплемента 3, CR3) связывает большое количество физиологических лигандов и участвует в многочисленных функциях НГ. Функционально CD11b (в присутствии субъединицы CD18) регулирует адгезию и миграцию НГ, является рецептором для C3bi, опосредующим поглощение и фагоцитоз и воспалительный ответ. Использование CD11b-антител позволило идентифицировать CD11b в качестве рецептора для гамма-цепи фибриногена, фактора X и ICAM1, доказывая участие в клеточно-опосредованной цитотоксичности, хемотаксисе и фагоцитозе [13].

В современной научной литературе существуют разные спорные данные по количеству НГ и плотности экспрессии данных рецепторов. Кроме того, CD64 рецептор был хорошо исследован только в неонатологии, и был предложен для выявления сепсиса у недоношенных и доношенных новорожденных [14–17]. Есть данные, демонстрирующие как более высокие, так и аналогичные параметры экспрессии CD64 НГ новорожденных детей по сравнению со здоровыми взрослыми [18, 19]. Сообщалось о более высоком проценте CD64⁺НГ, но с одинаковой интенсивностью экспрессии у недоношенных новорожденных в сравнении с взрослыми [20]. Опубликованы данные об отсутствии разницы в плотности экспрессии CD64 у недоношенных, здоровых доношенных новорожденных и взрослых субъектов [21].

Аналогичные вариации сравнительных результатов у новорожденных и взрослых о более высокой, более низкой и сходной экспрессии можно найти в работах по изучению CD16 (FcγRIII), CD32 (FcγRII) и CD11b [18–22; 24]. Отмечено, что CD16 антиген может быть шеддингован с поверхности НГ в результате воспаления, при септицемии, респираторном дистресс-синдроме [22, 25]. И наоборот, чрезмерно активная манипуляция с НГ (центрифугирование, выделение на градиенте плотности, шейкерование и т.д.) может высвобождать внутриклеточные пулы хранения CD16, что вызывает искусственное увеличение его поверхностной экспрессии [26]. Авторами de Hass M. и др. сообщалось о пациентах с наследственными аутоиммунными заболеваниями, на поверхностной мембране НГ которых полностью отсутствовал

CD16, что, тем не менее, не было связано с повышенным риском инфицирования [27]. Разные данные об экспрессии CD11b также могут быть связаны с тем, что этот антиген имеет обширный внутриклеточный пул хранения, который может высвобождаться на поверхность НГ при активации или чрезмерной манипуляции [28–30].

Имеются спорные литературные данные об уровнях CD64, CD16, CD32, CD11b рецепторов на НГ новорожденных и взрослых лиц. При этом полностью отсутствует научная информация об экспрессии CD64, CD16, CD32, CD11b на поверхностной мембране НГ у детей разных возрастных групп, а также о плотности их экспрессии. В связи с изложенным, изучение этой субпопуляции НГ в процессе постнатального онтогенеза у детей требует дальнейших исследований. Следует подчеркнуть, что изучение данной группы рецепторов НГ при физиологических состояниях, проводимое с учетом возрастных особенностей, необходимо для правильной интерпретации трансформации фенотипа, изменений поверхностной экспрессии рецепторов, при патологических состояниях, а также для уточнения возможностей дальнейшего перепрограммирования НГ в терапевтических целях.

Целью исследования явилось изучение субпопуляций нейтрофильных гранулоцитов и их фенотипических характеристик у здоровых доношенных новорожденных, условно-здоровых детей различных возрастных групп и условно-здоровых взрослых субъектов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование было проведено на образцах периферической крови, полученных у 79 человек: 22 здоровых новорожденных обоего пола (10 девочек, 12 мальчиков, в возрасте от 3–6 суток, массой тела 2880–4370 г., гестационный возраст – 38–40 недель); 10 условно-здоровых детей (2–4 лет, 5 девочек и 5 мальчиков); 17 детей (5–9 лет, 10 девочек, 7 мальчиков) и 20 условно-здоровых взрослых добровольцев обоего пола (от 19–48 лет). У всех исследуемых или их родителей (опекунов) было получено информированное согласие на участие в исследовании и забор крови согласно Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации (WMA Declaration of Helsinki – Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects, 2013). Были сформированы следующие группы: группа 1 – здоровые доношенные новорожденные; группа 2 – условно здоровые дети 2–4 лет;

группа 3 – условно здоровые дети 5–9 лет; группа 4 – условно-здоровые взрослые субъекты. Оценивали %НГ, одновременно экспрессирующих CD64, CD16, CD32, CD11b, интенсивность флуоресценции этих молекул (MFI) методом проточной цитометрии (CYTOMICS FC500, Beckman Coulter, США) с использованием конъюгатов МКАТ CD16-ECD, CD64-FITC, CD32-PE и CD11b-PC5 («Beckman Coulter International S.A.», Франция). Субпопуляции НГ определяли методом последовательного гейтирования. Для отображения статистически значимых различий значений MFI в субпопуляциях НГ, для каждого из изучаемых рецепторов, кроме числовых показателей, использовали условные термины отражающие интенсивность флуоресценции (bright – яркий, mid – средний, dim – низкий). Обработка результатов проводилась с использованием пакета прикладных программ «IBM SPSS Statistic 20». Для сравнения групп по количественным признакам использовали непараметрические критерии: U-критерий Манна-Уитни и критерий Вилкоксона. При статистической обработке данных различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Установлено, что у детей различных возрастных групп и условно-здоровых субъектов в периферической крови (ПК) циркулируют две основные субпопуляции НГ – мажорная CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺ и минорная с фенотипом CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺ с разной плотностью экспрессии изучаемых рецепторов.

Так выявлено, что у группы доношенных здоровых новорожденных уровень общего количества лейкоцитов составил 12,30 (10,81; 13,71) × 10⁹/л, а относительное количество НГ 52,9 (48,3; 56,26)%. При этом 96,5 (94,85; 97,60)% НГ было представлено субпопуляцией CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺ с уровнем экспрессии CD16 – 58,6 (36,23; 77,50), MFI CD32 – 6,66 (5,48; 7,40) и MFI CD11b – 20,05 (17,03; 25,00). Субпопуляция CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺ встречалась в группе 1 в 1,28 (0,98; 2,50)% случаев, в норме являлась малочисленной, но хорошо оснащенной, на уровне мажорной субпопуляции, CD16, CD32, CD11b и дополнительным CD64 рецепторами. Так MFI, для CD64 составила 4,9 (3,91; 6,26), а для CD16 – 54,4 (39,08; 73,78), для CD32 – 8,91 (7,76; 9,94) и CD11b – 23,35 (20,20; 27,48). (рис. 1а).

Исследуемые образцы крови группы 2 (детей 2–4 лет) имели морфологические особенности

характерные для этого возрастного периода, когда еще не произошел второй физиологический перекрест: общее количество лейкоцитов — $7,25 (6,67; 8,25) \times 10^9/\text{л}$, преобладание лимфоцитов — $50,0 (47,50; 55,00)\%$ и сниженный уровень НГ — $41,0 (37,0; 47,0)\%$ в ПК. При этом, относительное содержание как $\text{CD64}^+\text{CD16}^+\text{CD32}^+\text{CD11b}^+$, так и $\text{CD64}^+\text{CD16}^+\text{CD32}^+\text{CD11b}^+\text{НГ}$ не отличалось от показателей группы 1 ($p>0,05$). Однако, обе субпопуляции НГ в этой группе 2, отличались более высоким уровнем плотности экспрессии CD16, особенно выраженном на $\text{CD64}^+\text{CD16}^+\text{CD32}^+\text{CD11b}^+\text{НГ}$ (таб. 1; рис. 16). Так, субпопуляция $\text{CD64}^+\text{CD16}^+\text{CD32}^+\text{CD11b}^+\text{НГ}$ группы 2 была в 2,26 раза интенсивней оснащена CD16 ($p<0,05$) и имела схожие значения MFI CD32 и MFI CD11b с показателями группы 1 ($p_1>0,05$; $p_2>0,05$). Субпопуляция

$\text{CD64}^+\text{CD16}^+\text{CD32}^+\text{CD11b}^+\text{НГ}$ также отличалась достоверным повышением MFI CD16 в 1,68 раза и MFI CD64 в 1,9 раз ($p_1<0,05$; $p_2<0,05$) и тенденцией снижения MFI CD32 и MFI CD11b ($p>0,05$) (таб. 1, рис. 1а, б)

Показатели морфологической картины крови группы 3 (детей 5–9 лет) отражали снижение общего количества лейкоцитов до $5,5 (5,00; 6,15) \times 10^9/\text{л}$ и повышение количества НГ до $48,78 (44,0; 54,0)\%$, наблюдаемые после второго физиологического перекреста. Анализ изучаемых показателей субпопуляций НГ позволил выявить снижение количества $\text{CD64}^+\text{CD16}^+\text{CD32}^+\text{CD11b}^+\text{НГ}$ в 2 раза по сравнению с показателями группы 1 новорожденных и 2,92 раза с группой 2 детей младшего возраста ($p_1<0,05$; $p_2<0,05$). Так же отмечено незначительное снижение $\text{CD64}^+\text{CD16}^+\text{CD32}^+\text{CD11b}^+\text{НГ}$ до 93,3

Таблица 1. Субпопуляции нейтрофильных гранулоцитов и плотность экспрессии поверхностных рецепторов CD64, CD16, CD32, CD11b у здоровых доношенных новорожденных, условно-здоровых детей разных возрастных групп и условно-здоровых взрослых субъектов

	Здоровые доношенные Новорождённые Группа 1	Здоровые дети 2–4 лет Группа 2	Здоровые дети 5–9 лет Группа 3	Здоровые взрослые Группа 4
$\text{CD64}^+\text{CD16}^+\text{CD32}^+\text{CD11b}^+$ Me (Q1; Q3)				
%НГ	96,5* (94,85; 97,30)	96,01* (95,58; 97,60)	93,3* ^v (91,30; 95,20)	92,1 (91,08; 92,98)
MFI CD16	58,6 (36,23; 77,50)	132,5* [■] (117,5; 144,50)	83,7* ^v # [•] (79,0; 99,30)	71,05 (62,05; 74,13)
MFI CD32	6,66 (5,48; 7,40)	5,06* (4,34; 6,18)	6,14* (5,63; 9,88)	7,01 (6,31; 7,89)
MFI CD11b	20,05* (17,03; 25,00)	22,4 (12,18; 25,75)	17,5 (14,70; 21,0)	12,75 (10,65; 15,53)
$\text{CD64}^+\text{CD16}^+\text{CD32}^+\text{CD11b}^+$ Me (Q1; Q3)				
%НГ	1,25* (0,98; 2,50)	1,75* [■] (1,40; 1,93)	0,6 ^v # (0,20; 0,70)	0,5 (0,40; 0,68)
MFI CD64	4,90* (3,91; 6,26)	9,35* [■] (9,24; 9,57)	6,1* ^v (4,34; 7,03)	12,4 (10,85; 14,63)
MFI CD16	54,4* (39,08; 73,48)	91,55* [■] (82,18; 106,48)	83,4* ^v # [•] (70,20; 99,30)	14,05 (10,08; 32,20)
MFI CD32	8,91* (7,66; 9,94)	6,51* (5,02; 8,92)	9,54 ^v (7,77; 15,40)	11,25 (10,43; 15,9)
MFI CD11b	23,35* (20,2; 27,48)	19,8 (13,40; 26,93)	13,3 (8,80; 25,50)	15,4 (12,65; 17,33)

Примечание: * — достоверность отличия показателей от значений группы 4, $p<0,05$; [■] — достоверность отличия показателей группы 1 от группы 2, $p<0,05$; # — достоверность отличия показателей группы 1 от группы 3, $p<0,05$; ^v — достоверность отличия показателей группы 2 от группы 3, $p<0,05$; [•] — достоверность отличия показателей группы 3 от группы 4, $p<0,05$.

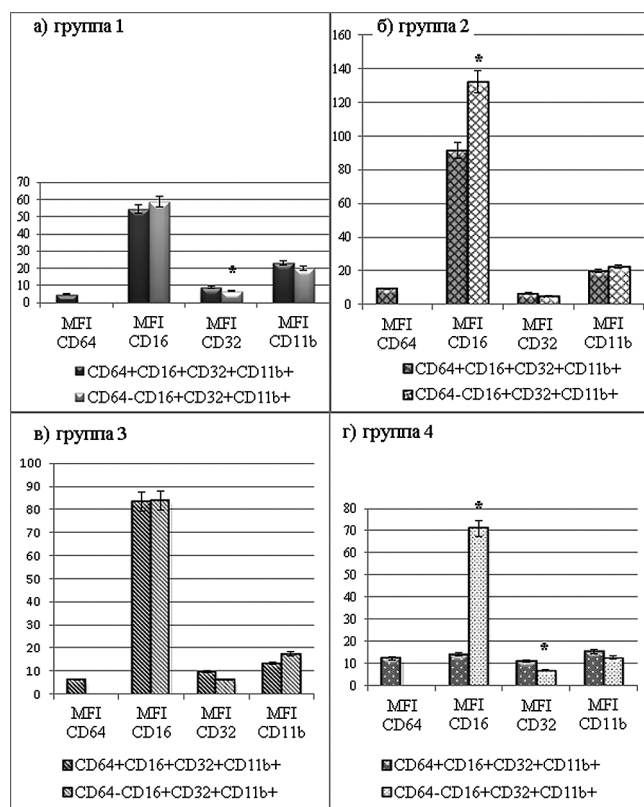


Рис 1. Плотность экспрессии CD64, CD16, CD32, CD11b рецепторов мажорной и минорной субпопуляции нейтрофильных гранулоцитов у здоровых новорожденных (группа 1), условно-здоровых детей 2–4 лет (группа 2), 5–9 лет (группа 3) и условно-здоровых взрослых субъектов (группа 4).

Примечание: * $p < 0,05$;

(91,30; 95,20)% ($p > 0,05$) (таб. 1, рис. 1а, б, в). НГ мажорной и минорной субпопуляции группы 3 имели сходные значения MFI CD16, CD32, CD11b (рис. 1а, б, в; таб. 1). При этом регистрировалась более высокая MFI CD16 в обеих субпопуляциях НГ по сравнению с показателями группы 1, и напротив, более низкая в сравнении со значениями группы 2 ($p_1 < 0,05$; $p_2 < 0,05$). Показатели MFI CD32 и MFI CD11b субпопуляции CD64-CD16+CD32+CD11b+ НГ сохранялись на том же уровне, что и в группе 1 и 2 (рис. 1а, б, в). Для минорной субпопуляции характерно снижение MFI CD64 и MFI CD11b как в сравнении с показателями группы 1, так и группы 2, на фоне незначительного повышения MFI CD32 (таб. 1).

При исследовании образцов крови условно-здоровых взрослых субъектов показано, что субпопуляция CD64-CD16+CD32+CD11b+ НГ представлена 92,10 (91,08; 92,98)% НГ, а CD64+CD16+CD32+CD11b+ НГ составляют лишь 0,5 (0,40; 0,68)%. В отличие от исследуемых групп детей

субпопуляции НГ в группе 4 были по-разному оснащены изучаемыми рецепторами (рис. 1г). Так, выявлено, что CD64-CD16+CD32+CD11b+ НГ в 5 раз интенсивней экспрессирует CD16 ($p < 0,05$) в 1,6 раз ниже CD32 ($p < 0,05$) по сравнению с субпопуляцией CD64+CD16+CD32+CD11b+ НГ, при одинаковом уровне CD11b ($p > 0,05$). CD64+CD16+CD32+CD11b+ НГ здоровых взрослых имеют наиболее высокий MFI CD64 – 12,4 (10,85; 14,63), самый низкий MFI CD16 – 14,05 (10,08; 32,2) в сравнении с показателями других групп (рис. 1г).

Установлено, что уровень экспрессии CD16 рецепторов НГ с фенотипом CD64-CD16+CD32+CD11b+ здоровых взрослых составил 71,05 (62,05; 74,13), но достоверно не отличался от показателей доношенных новорожденных, был ниже в 1,2 раза значений группы 3 (детей 5–9 лет) и в 2 раза группы 2 (дети 2–4 года) ($p_1 < 0,05$; $p_2 < 0,05$). Уровень экспрессии CD11b на НГ мажорной субпопуляции достоверно не отличался от показателей группы 3 и был в 1,6 раз ниже

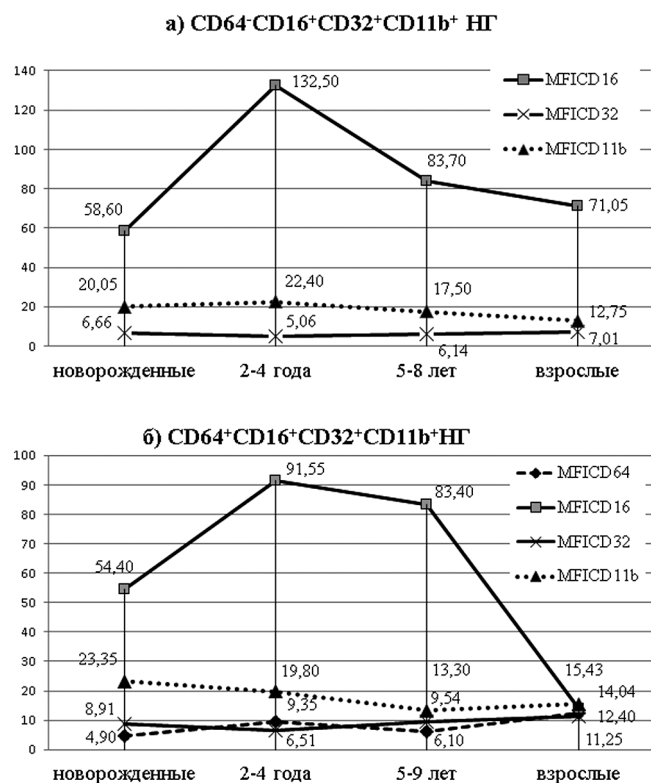


Рис 2. Динамика изменения уровня экспрессии рецепторов субпопуляций нейтрофильных гранулоцитов CD64-CD16+CD32+CD11b+ (а) и CD64+CD16+CD32+CD11b+ (б) в исследуемых группах здоровых доношенных новорожденных, условно-здоровых детей и условно-здоровых взрослых субъектов.

MFI CD11b группы 1 и в 1,8 раз ниже значений регистрируемых в группе 2 ($p_1 < 0,05$; $p_2 < 0,05$) (рис. 2а).

Выявлено, что MFI CD16 рецепторов НГ субпопуляции с фенотипом CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺ здоровых взрослых был в 3,9 раза ниже значений в группе 1, и в 6 раз ниже в группах 2 и 3. ($p_1 < 0,05$; $p_2 < 0,05$; $p_3 < 0,05$) (рис. 2б). Уровень экспрессии CD11b на НГ минорной субпопуляции не отличался от показателей группы 3 и группы 2 и был в 1,5 раз ниже значений MFI CD11b группы 1. При этом, уровень оснащения CD64 в исследуемой группе 1 был в 2,5 раза ниже, в группе 2 — в 1,3 раза, в группе 3 в 3 раза ниже по сравнению с параметрами НГ взрослой группы. (таб. 1; рис. 2б).

Таким образом, сравнительный анализ уровня экспрессии рецепторов субпопуляций НГ с фенотипом CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺, и особенно CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺НГ, в изучаемых группах новорожденных детей, детей разных возрастных групп и здоровых взрослых демонстрирует разную оснащенность CD16 и CD11b рецепторами и более стабильный уровень экспрессии CD32 (рис. 2б).

ОБСУЖДЕНИЕ

По результатам сравнительного анализа выявлено, что обе субпопуляции НГ (мажорная и минорная) в исследуемых группах имеют фенотипические особенности, что объясняется состоянием иммунной системы характерной для каждого изучаемого периода, преобладающими или наиболее оптимальными эффекторными механизмами НГ в каждый возрастной период. Используя для визуализации различий плотности экспрессии рецепторов термины, отражающие разницу значений MFI (bright — яркий, mid — средний, dim — низкий), показано, что НГ группы здоровых взрослых представлены субпопуляциями с фенотипами CD64⁺CD16^{mid}CD32^{dim}CD11b^{dim}НГ и CD64^{bright}CD16^{dim}CD32^{mid}CD11b^{dim}НГ. Такое оснащение НГ обеспечивает ограниченный ответ и защищает от необоснованных воспалительных реакций и повреждения тканей. Показатели уровня экспрессии НГ мажорной субпопуляции группы детей 5–9 лет после физиологического перекреста представлена фенотипом CD64⁺CD16^{mid}CD32^{dim}CD11b^{dim}НГ и имеет значения схожие по оснащению с субпопуляцией взрослых лиц. Минорная субпопуляция этой возрастной группы 3 имеет низкий уровень CD64 и высокий CD16 рецептор, отвечающий за цитотокси-

ческую функцию НГ и представлена фенотипом CD64^{dim}CD16^{bright}CD32^{mid}CD11b^{dim}НГ.

Для группы 1 доношенных новорожденных детей характерны фенотипы CD64⁺CD16^{dim}CD32^{dim}CD11b^{bright}НГ и CD64^{dim}CD16^{mid}CD32^{bright}CD11b^{bright}НГ. Вероятно, такое оснащение объясняется незрелостью иммунной системы, высоким уровнем лейкоцитов, НГ и возможностью реализации эффекторных функций путем запуска фагоцитоза через распознавание неопсонизированного патогена через TLRs, такие как TLR4 (CD284), или взаимодействие с липополисахаридом (LPS) грамотрицательных бактерий и TLR2 (CD282) с пептидогликаном, липотейхоевой кислотой грамположительных бактерий. Это, в свою очередь, может привести к регуляции CD64, повышению экспрессии его на НГ, что приводит к запуску мощного окислительного взрыва и увеличению фагоцитарного потенциала. Эффективность фагоцитоза также обеспечивают поверхностные рецепторы CR3 (CD11b / CD18), способные распознавать опсонизированные компонентами комплемента микробы.

Для группы 2 условно-здоровых детей 2–4 лет характерны фенотипы CD64⁺CD16^{bright}CD32^{dim}CD11b^{bright} и CD64^{mid}CD16^{bright}CD32^{dim}CD11b^{bright}НГ. Показатели этой группы имеют самые высокие уровни экспрессии CD16, CD11b, отражающие, по-видимому, компенсаторную активацию и готовность НГ к осуществлению эффекторных функций на фоне значительного физиологического снижения их количества в этот возрастной период.

В результате исследования получены новые данные о субпопуляциях НГ и их количестве и фенотипических особенностях, характерных для здоровых новорожденных и детей разных возрастных групп по сравнению с группой взрослых условно-здоровых лиц.

Выявлено, что в периферической крови здоровых доношенных новорожденных и детей 2–4 содержатся одинаковые уровни мажорной (~96%) и минорной (~1,25–1,75%) субпопуляции НГ. У детей 5–9 лет, после физиологического перекреста и взрослых отмечается снижение более чем в 2 раза количества минорной и снижение мажорной субпопуляции НГ.

Показано, что для каждой из исследуемых групп характерен свой фенотипический профиль, возможно оптимальный, для выполнения НГ своих эффекторных функций (таб. 2).

Установлено, что НГ новорожденных и детей разных возрастных групп имеют схожую

Таблица 2. Фенотипические профили субпопуляций нейтрофильных гранулоцитов характерных для здоровых доношенных новорожденных, условно-здоровых детей разных возрастных групп и условно-здоровых взрослых субъектов

Группы	Фенотипический профиль	
	CD64 ⁺ CD16 ⁺ CD32 ⁺ CD11b ⁺ мажорная субпопуляция	CD64 ⁺ CD16 ⁺ CD32 ⁺ CD11b ⁺ минорная субпопуляция
Здоровые доношенные новорождённые Группа 1	CD64 ⁺ D16 ^{dim} CD32 ^{dim} CD11b ^{bright}	CD64 ^{dim} CD16 ^{mid} CD32 ^{bright} CD11b ^{bright}
Здоровые дети 2–4 лет Группа 2	CD64 ⁺ D16 ^{bright} CD32 ^{dim} CD11b ^{bright}	CD64 ^{mid} CD16 ^{bright} CD32 ^{dim} CD11b ^{bright}
Здоровые дети 5–9 лет Группа 3	CD64 ⁺ CD16 ^{mid} CD32 ^{dim} CD11b ^{dim}	CD64 ^{dim} CD16 ^{bright} CD32 ^{mid} CD11b ^{dim}
Здоровые взрослые Группа 4	CD64 ⁺ CD16 ^{mid} CD32 ^{dim} CD11b ^{dim}	CD64 ^{bright} CD16 ^{dim} CD32 ^{mid} CD11b ^{dim}

плотность экспрессии рецепторов CD64, CD16, CD32, CD11b на мажорной и минорная субпопуляциях, в то время как субпопуляции НГ здоровых взрослых оснащены по-разному.

Полученные данные, в сочетании с появлением новых знаний о фенотипах НГ и их иммуномодулирующих функциях, ориентируясь на механизмы, которые регулируют эти функции, могут быть многообещающими для выявления дефектов функционирования НГ и разработке новых терапевтических подходов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Leliefeld P. H. C., Pillay J., Vrisekoop N., Heeres M., Tak T., Kox M., Rooijackers S. H. M., Kuijpers T. W., Pickkers P., Leenen L. P. H., Koenderman L. Differential antibacterial control by neutrophil subsets. *Blood Advances* 2018, 2(11), 344–1355. doi:10.1182/bloodadvances.2017015578.
2. Hong C. W. Current Understanding in Neutrophil Differentiation and Heterogeneity. *Immune Netw.* 2017, 7(5), 298–306. doi.org/10.4110/in.2017.17.5.298.
3. Mortaz E., Alipoor S. D., Adcock I. M., Mumby S., Koenderman L. Update on Neutrophil Function in Severe Inflammation. *Front. Immunol.* 2018. doi.org/10.3389/fimmu.2018.02171.
4. Garley M., Jabłońska E. Heterogeneity Among Neutrophils. *Archivum Immunologiae and Therapiae Experimentalis*, 2018, 66 (1), 21–30. doi: 10.1007/s00005-017-0476-4.
5. Нестерова И. В., Колесникова Н. В., Чудилова Г. А., Ломтатидзе Л. В., Ковалева С. В., Евлевский А. А., Нгуен Т. З. Л. Новый взгляд на нейтрофильные гранулоциты: переосмысление старых догм. *Инфекция и иммунитет* 2018, 8(1), 7–18. doi: 10.15789/2220-7619-2018-1-7-18. [Nesterova I. V., Kolesnikova N. V., Chudilova G. A., Lomtadidze L. V., Kovaleva S. V., Yevlevsky A. A., Nguyen T. Z. L. A new look at neutrophilic granulocytes: rethinking old dogmas. *Infection and immunity* 2018, 8(1), 7–18.] doi: 10.15789/2220-7619-2018-1-7-18.]
6. Pincetic A., Bournazos S., DiLillo D. J., Maamary J., Wang T. T., Dahan R., Fiebigierand B. M., Ravetch J. V. Type I and type II Fc receptors regulate innate and adaptive immunity. *Nat. Immunol.* 2014, 15, 707–716. doi:10.1038/ni.2939.
7. Bournazos S., Wang T. T., Ravetch J. V. The Role and Function of Fcγ Receptors on Myeloid Cells. *Microbiol Spectr.* 2016, 4(6), doi:10.1128/microbiolspec.MCHD-0045–2016.
8. Jakus Z., Németh T., Verbeek J. S., Mócsai A. Critical but overlapping role of FcγRIII and FcγRIV in activation of murine neutrophils by immobilized immune complexes. *J Immunol.* 2008, 180, 618–629. doi.org/10.4049/jimmunol.180.1.618.
9. Coxon A., Cullere X., Knight S., Sethi S., Wakelin M. W., Stavrakis G. FcγRIII mediates neutrophil recruitment to immune complexes. A mechanism for neutrophil accumulation in immune-mediated inflammation. *Immunity.* 2001, 14, 693–704. doi.org/10.1016/S1074-7613(01)00150-9.
10. Zhou M. J., Lublin D. M., Link D. C., Brown E. J. Distinct tyrosine kinase activation and Triton X-100 insolubility upon FcγRII or FcγRIIIB ligation in human polymorphonuclear leukocytes. Implications for immune complex activation of the respiratory burst. *J Biol Chem.* 1995, 270, 13553–13560. doi: 10.1074/jbc.270.22.13553.
11. Quayle J. A., Watson F., Bucknall R. C., Edwards S. W. Neutrophils from the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis express the high affinity immunoglobulin G receptor, Fc gamma RI (CD64): role of immune complexes and cytokines in induction of receptor expression. *Immunology.* 1997, 91(2), 266–273. doi.org/10.1046/j.1365–2567.1997.00249.x.
12. Gericke G. H., Ericson S. G., Pan L., Mills L. E., Guyre P. M., Ely P. Mature polymorphonuclear leukocytes express high-affinity receptors for IgG (Fc gamma RI) after stimulation with granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF). *J Leukoc Biol.* 1995, 57(3), 455–61. doi.org/10.1002/jlb.57.3.455.

13. Deevi R. K., Koney-Dash M., Kissenpfennig A., Johnston J. A., Schuh K., Walter U. Vasodilator-stimulated phosphoprotein regulates inside-out signaling of $\beta 2$ integrins in neutrophils. *J Immunol.* 2010, 184, 6575–6584. doi.org/10.4049/jimmunol.0903910.
14. Groselj-Grenc M., Ihan A., Pavcnik-Arnol M., Kopitar A. N., Gmeiner-Stopar T., Derganc M. Neutrophil and monocyte CD64 indexes, lipopolysaccharide-binding protein, procalcitonin and C-reactive protein in sepsis of critically ill neonates and children. *Intensive Care Med.* 2009, 35 (11), 1950–1958. doi 10.1007/s00134-009-1637-7.
15. Tang Z., Qin D., Tao M., Lv K., Chen S., Zhu X., Li X., Chen T., Zhang M., Zhong M., Yang H., Xu Y., Mao S. Examining the utility of the CD64 index compared with other conventional indices for early diagnosis of neonatal infection. *Scientific reports.* 2018, 8(1), 9994. doi:10.1038/s41598-018-28352-7.
16. Lam H. S., Wong S. P. S., Cheung H. M., Chu W. C. W., Wong R. P. O., Chui K. M., Liu F. Y. B., Li K., Fok T. F., Ng P. C. Early diagnosis of intra-abdominal inflammation and sepsis by neutrophil CD64 expression in newborns. *Neonatology.* 2011, 99(2), 118–124. doi.org/10.1159/000311289.
17. Нестерова И.В., Чудилова Г.А., Ломтатидзе Л.В., Ковалёва С.В., Сапун О.И., Клещенко Е.И., Смерчинская Т.В. Ремоделирование фенотипа субпопуляций CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺ и CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺ нейтрофильных гранулоцитов при врожденной пневмонии у глубоко недоношенных новорожденных. *Российский иммунологический журнал.* 2014, 8, 1(17), 48–53. [Nesterova I. V., Chudilova G. A., Lomtadize L. V., Kovaleva S. V., Sapun O. I., Kleschenko E. I., Smerchinskaya T. V. Remodeling of the phenotype of CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺ and CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺ subtypes of neutrophilic granulocytes in congenital pneumonia in deeply preterm infants. *Rossiiskij immunologicheskij zhurnal = Russian journal of immunology*, 2014, 8, 1(17), 48–53.]
18. Mawas F., Wiener E., Ryan G., Soothill P. W., Rodeck C. H. The expression of IgG Fc receptors on circulating leukocytes in the fetus and new-born. *Transfus. Med.* 1994, 4, 25–33. doi.org/10.1111/j.1365–3148.1994.tb00240.x.
19. Maeda M., van Schie R. C., Yuksel B., Greenough A., Fanger M. W., Guyer P. M., Lydyard P. M. Differential expression of Fc receptors for IgG by monocytes and granulocytes from neonates and adults. *Clin. Exp. Immunol.* 1996, 103, 343–347. doi: 10.1046 / j.1365–2249.1996.d01–615.x.
20. Payne N. R., Frestedt J., Hunkeler N., Gehrz R. Cell surface expression of immunoglobulin G receptors on the polymorphonuclear leukocytes and monocytes of extremely premature infants. *Pediatr. Res.* 1993, 33, 452–457. doi: 10.1203/00006450-199305000-00007.
21. Falconer A. E., Carr R., Edwards S. W. Neutrophils from preterm neonates and adults show similar cell surface receptorexpression: analysis using a whole blood assay. *Biol. Neonate* 1995, 67, 26–33. doi.org/10.1159/000244139.
22. Smith J. B., Campbell D. E., Ludomirsky A., Polin R. A., Douglas S. D., Garty B.-Z., Harris M. C. Expression of the complement receptor CR1 and CR3 and the type III FC γ receptor on neutrophil from newborn infants and from fetuses with Rh disease. *Pediatr. Res.* 1990, 28, 120–126. doi: 10.1203/00006450-199008000-00009.
23. Carr R., Davies J. M. Abnormal FCRIII expression by neutrophils from very preterm neonates. *Blood.* 1990, 76, 607–611.
24. Fjaertoft G., Håkansson L., Foucard T., Ewald U., Venge P. CD64 (Fc γ receptor I) cell surface expression on maturing neutrophils from preterm and term newborn infants. *Acta Paediatr.* 2005, 94(3), 295–302.
25. Kabutomori O., Iwatani Y., Koh T., Yanagihara T. CD16 antigen density on neutrophils in chronic myeloproliferative disorders. *Am. J. Clin. Pathol.* 1997, 107, 661–664. doi.org/10.1093/ajcp/107.6.661.
26. Qian W., Huang G. Z. Neutrophil CD64 as a marker of bacterial infection in acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Immunol. Invest.* 2016, 45(6), 490–503. doi: 10.1080/08820139.2016.1177540
27. de Hass M., Kleijer M., van Zwieten R., Roos D., von dem Borne A. E. Neutrophil Fc γ RIIIb deficiency, nature, and clinical consequences: a study of 21 individuals from 14 families. *Blood* 1995, 86, 2403–2413.
28. Rebuck N., Gibson A., Finn A. Neutrophil adhesion molecules in term and premature infants: normal or enhanced leukocyte integrins but defective L-selectin expression and shedding. *Clin. Exp. Immunol.* 1995, 101, 183–189. PMC1553291.
29. Reddy R. K., Xia Y., Hanikyrova M., Ross G. D. A mixed population of immature and mature leukocytes in umbilical cord blood results in a reduced expression and function of CR3 (CD11b/CD18). *Clin. Exp. Immunol.* 1998, 114, 462–467. doi: 10.1046/j.1365–2249.1998.00743.x.
30. Falconer A. E., Carr R., Edwards S. W. Neutrophils from preterm neonates and adults show similar cell surface receptor expression: analysis using a whole blood assay. *Biol. Neonate.* 1995, 67, 26–33. doi: 10.1159/000244139.

PHENOTYPIC PROFILE SUBSET CD64⁻CD16⁺CD32⁺CD11b⁺, CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺ NEUTROPHIL GRANULOCYTES IN HEALTHY NEWBORNS, CONDITIONALLY HEALTHY CHILDREN OF DIFFERENT AGE GROUPS AND CONDITIONALLY HEALTHY ADULT INDIVIDUALS

© 2019 G. A. Chudilova^{1*}, I. V. Nesterova^{1,2}

*E-mail: chudilova2015@yandex.ru

¹Department of Clinical and Experimental Immunology and Molecular Biology of the Central Research Laboratory Federal State Budget Educational Institution of Higher Education «Kuban State Medical University» of Ministry of Health Development of Russia, Krasnodar, Russia;

²Department of Allergology and Immunology of Federal State Budget Educational Institution of Higher Professional Education «Peoples' Friendship University of Russia» of Ministry of Education and Science of Russia, Moscow, Russia

Received: 11.01.2019. Accepted: 30.01.2019

Neutrophilic granulocytes (NG) with different receptor equipment are heterogeneous subpopulations that have differences in their biological properties and role in the pathogenesis of immune diseases. In result of research we obtained new data on the phenotypic features of NG subpopulations carrying the CD64, CD32, CD16 and CD11b molecules in newborns and children compared to the group of adult healthy individuals. It has been established that in the peripheral blood of healthy full-term newborns, conditionally healthy children of different age and conditionally healthy adults there are two main subpopulations of circulate NG – major with CD64⁻CD16⁺CD32⁺CD11b⁺ phenotype and minor CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺ phenotype, different receptor expression density noted in both subpopulations. It was shown that each of the studied groups has its own phenotypic profile, possibly optimal for performing NG effector functions. In newborns are identified phenotypes CD16^{dim}CD32^{dim}CD11b^{bright}NG and CD64^{dim}CD16^{mid}CD32^{bright}CD11b^{bright}NG, in children 2–4 years old CD64⁻CD16^{bright}CD32^{dim}CD11b^{bright}NG and CD64^{mid}CD16^{bright}CD32^{dim}CD11b^{bright}NG, in children 5–9 years old CD64⁻CD16^{mid}CD32^{dim}CD11b^{dim}NG and CD64^{dim}CD16^{bright}CD32^{mid}CD11b^{dim}NG, in conditionally healthy adults CD64⁻CD16^{mid}CD32^{dim}CD11b^{dim}NG and CD64^{bright}CD16^{dim}CD32^{mid}CD11b^{dim}NG. Study shown that the NG of newborns and children of different age groups have a similar expression density of the CD64, CD16, CD32, CD11b receptors in major and minor subpopulations, NG subpopulations of healthy adults are equipped differently. The study of receptors in physiological according to age-related features is necessary for the correct interpretation of the transformation of the phenotype, changes in surface receptors expression in various pathological conditions.

Key words: neutrophilic granulocytes, phenotype, subset

Authors:

Chudilova G. A., ☐ PhD (Biological Sciences), Associate Professor, Head of the Department of Clinical and Experimental Immunology and Molecular Biology of the Central Research Laboratory Federal State Budget Educational Institution of Higher Education «Kuban State Medical University» of Ministry of Health Development of Russia, Krasnodar, Russia; 350061, Krasnodar, Blagoeva, 14–11, Phone 8–9184102214(mob.), E-mail: chudilova2015@yandex.ru;

Nesterova I. V., Doctor of Medical Sciences (DM), Professor, Professor of the Department of Allergology and Immunology of Federal State Budget Educational Institution of Higher Professional Education «Peoples' Friendship University of Russia» of Ministry of Education and Science of Russia, Moscow, Russia; Chief Researcher of Department of Clinical and Experimental Immunology and Molecular Biology of Central Research Laboratory of Federal State Budget Educational Institution of Higher Education «Kuban State Medical University» of Ministry of Health Development of Russia, Krasnodar, Russia.