

НЕОДНОЗНАЧНОСТЬ ВЛИЯНИЙ РЕГУЛЯТОРНЫХ ПЕПТИДОВ И РЕКОМБИНАНТНОГО IFN α НА ФЕНОТИП СУБПОПУЛЯЦИИ CD66b⁺CD33⁺CD16⁺CD11b⁺ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ В СИСТЕМЕ *IN VITRO*

© 2019 г. И. В. Нестерова^{1,2*}, Г. А. Чудилова¹, С. В. Ковалева¹,
Л. В. Ломтатидзе¹, Т. В. Русинова¹, В. А. Тараканов¹,
Н. К. Барова¹, В. Н. Павленко¹

*E-mail: inesterova1@yandex.ru

¹ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет»
Минздрава России, Краснодар, Россия

²ФГБОУ ВО «Российский университет дружбы народов» Министерства
образования и науки России, Москва, Россия

Поступила: 14.03.2019. Принята: 26.03.2019

Воспроизведена в системе *in vitro* модель бактериального процесса под действием fMLP, позволившая выявить особенности трансформации CD66b⁺CD33⁺CD16⁺CD11b⁺ нейтрофильных гранулоцитов (НГ). Выявлены разнонаправленные эффекты моновливания пептидов и rIFN α 2b на экспрессию изучаемых маркеров НГ у условно-здоровых детей. Модулирующее влияние rIFN α 2b на трансформированный fMLP фенотип НГ сопряжено с поляризацией в противовоспалительный фенотип.

Ключевые слова: нейтрофильные гранулоциты, фенотип, субпопуляции

DOI: 10.31857/S102872210006645-4

Адрес: 117513, г. Москва, Ленинский проспект, 123–1, ФГБОУ ВО «Российский университет дружбы народов», кафедра аллергологии и иммунологии, Нестерова Ирина Вадимовна. Тел.: 8 (916) 187 73 41 (моб.).

E-mail: inesterova1@yandex.ru

Авторы:

Нестерова И. В., д.м.н., профессор, профессор кафедры аллергологии и иммунологии, Российский университет дружбы народов, Москва, Россия; г.н.с. ЦНИЛ, КубГМУ, Краснодар, Россия;

Чудилова Г. А., к.б.н., доцент, зав. отделом клинико-экспериментальной иммунологии и молекулярной биологии ЦНИЛ, КубГМУ, Краснодар, Россия;

Ковалева С. В., к.м.н., доцент, с.н.с. ЦНИЛ КубГМУ, Краснодар, Россия;

Ломтатидзе Л. В., к.б.н., с.н.с. ЦНИЛ, КубГМУ, Краснодар, Россия;

Русинова Т. В., к.б.н., н.с. ЦНИЛ, КубГМУ, Краснодар, Россия;

Тараканов В. А., д.м.н., профессор, зав. кафедрой хирургических болезней детского возраста, КубГМУ, Краснодар, Россия;

Барова Н. К., к.м.н., ассистент кафедры хирургических болезней детского возраста, КубГМУ, Краснодар, Россия;

Павленко В. Н., ординатор кафедры клинической иммунологии, аллергологии и лабораторной диагностики ФПК и ППС, КубГМУ, Краснодар, Россия.

Нейтрофильные гранулоциты (НГ) способны выполнять различные функции, нередко диаметрально противоположные: про- и противовоспалительные, регулирующие, активирующие и супрессирующие, про- и противоопухолевые и другие, напрямую зависящие от рецепторного оснащения, интра- и экстрацеллюлярного окружения клетки [1–3]. Известные факты о пластичности НГ представляют интерес для использования НГ в качестве экспериментальной модели инфекционно-воспалительного процесса как для установления вариантов неадекватного реагирования (дефектного, гиперэргического), так и с целью изучения возможностей коррекции дискордантной работы НГ под влиянием цитокинов и иммуотропных пептидов. При включении НГ в иммунный ответ происходит дополнительная транслокация внутриклеточных резервных пулов рецепторов на мембрану, что проявляется в приросте высокооснащенных активированных НГ [1–3]. Интерес представляет изучение влияния различных пептидов и рекомбинантного IFN α 2b (rIFN α 2b) на

НГ, конститутивно оснащенные CD16, CD33, CD66b и CD11b, активно участвующими в запуске, регуляции и разрешении воспалительного процесса. Гексапептидаргинил-альфа-аспартил-лизил-валил-тирозил-аргинин (ГП) обладает иммунорегуляторными свойствами, а также способностью вызывать инактивацию свободно-радикальных и перекисных соединений. Глюкозаминил-мурамилдипептид (ГМДП) – аналог пептидогликана клеточной стенки бактерий специфически взаимодействуя с NOD2-рецепторами, активирует НГ, запуская синтез провоспалительных цитокинов. $\text{rIFN}\alpha 2\text{b}$ оказывает противовирусное действие, обусловленное взаимодействием со специфическими мембранными рецепторами, запускающими синтез РНК; обладает иммуномодулирующей активностью, связанной с активацией фагоцитоза, стимуляцией образования антител и цитокинов. В основе антибактериального эффекта IFN лежит способность индуцировать активность ферментов (индоламин-2,3-дезоксигеназу, NO-синтетазу) в клетке, которые способствуют разрушению бактерии. N-формил-метионил-лейцил-фенилаланин (fMLP) имеет экзогенное (белок многих бактерий) и эндогенное (в митохондриях человека) происхождения и используется для создания экспериментальной модели бактериального процесса, так как активирует широкий спектр сигнальных путей, индуцирует хемотаксис, фагоцитоз, генерацию активных форм кислорода и высвобождение антимикробных молекул из гранул НГ.

Цель исследования: Изучение эффектов влияния fMLP, ГМДП, ГП, $\text{rIFN}\alpha 2\text{b}$ на уровень экспрессии функционально значимых рецепторов НГ (CD16, CD66b, CD33, CD11b) у здоровых детей в эксперименте *in vitro*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследованы образцы периферической крови (ПК) 10 здоровых детей 3,5–5,5 лет. Проведена оценка количества НГ (%) и плотность экспрессии (MFI) их мембранных рецепторов CD16, CD66b, CD33, CD11b (МКАТ «Beckman Coulter International S.A.», Франция) на НГ: 1) ПК (контроль); 2) моноинкубация с $\text{rIFN}\alpha 2\text{b}$, ГМДП, ГП (в концентрациях 10^{-6} г/л), fMLP (10^{-7} М); 3) на НГ, трансформированных под влиянием fMLP и $\text{rIFN}\alpha 2\text{b}$, ГМДП, ГП. Инкубацию проводили в течение 1 часа при 37 °С. Статистическая обработка StatPlus 2009.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ полученных данных продемонстрировал, что НГ ПК условно-здоровых детей в 97,03% (94,31; 98,40) одновременно оснащены рецепторами CD16, CD66b, CD33, CD11b с разной плотностью экспрессии. Так, выявлен высокий уровень MFI CD16 – 139,0 (115,3; 152,3), низкий MFI CD66b – 4,6 (4,2; 5,0), MFI CD33 – 3,7 (3,3; 4,6) и средний MFI CD11b – 18,3 (15,8; 21,0). Инкубация ПК с fMLP приводила к достоверному значительному увеличению плотности экспрессии на НГ CD66b (в 2,5 раза), CD11b (в 1,9 раза), CD16 (в 1,4 раза), что свидетельствует о готовности к адекватному активному ответу НГ здоровых детей на экзо- и эндогенные воздействия. Отсутствие активации CD33 после стимуляции fMLP НГ в контрольной группе, говорит о рефрактерности этого рецептора к хемотаксическим стимулам. Инкубация ПК с $\text{rIFN}\alpha 2\text{b}$ выявила разнонаправленное влияние на экспрессию изучаемых рецепторов. Показано достоверное возрастание MFI CD66b (в 1,5 раза) и снижение MFI CD11b (в 1,4 раза) на фоне отсутствия эффектов по отношению к MFI CD33 и MFI CD16. Вероятно, что под действием $\text{rIFN}\alpha 2\text{b}$ НГ реагируют как при вирусной инфекции: происходит усиление хемотаксических свойств клетки, сдерживание запуска фагоцитоза и перепрограммирование НГ на реакцию АЗКЦ. ГМДП не влиял на экспрессию изучаемых рецепторов НГ у условно-здоровых детей, проявив свои известные модулирующие свойства: выявлены лишь тенденции к незначительному увеличению MFI CD16, MFI CD66b и снижению уровня экспрессии CD33 и CD11b. Инкубация ПК с ГП позволила выявить эффекты, противоположные ГМДП: снижение уровня экспрессии CD33 (в 1,3 раза) и CD11b (в 2 раза) и отсутствие эффекта по отношению к рецепторам CD16 и CD66b. При оценке совместного воздействия fMLP и изучаемых пептидов установлено, что плотность экспрессии определяемых рецепторов оставалась на уровне показателей профиля НГ, активированного под влиянием fMLP. При этом при инкубации НГ ПК с fMLP и $\text{rIFN}\alpha 2\text{b}$ были выявлены тенденции к снижению плотности экспрессии CD16 и повышению CD66b и CD11b рецепторов по отношению к значениям, регистрируемым при действии fMLP.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в результате исследования была воспроизведена в системе *in vitro* модель

бактериального процесса при инкубации НГ ПК с fMLP, позволившая выявить трансформацию фенотипа CD66b⁺CD33⁺CD16⁺CD11b⁺ НГ в виде усиления экспрессии всех изучаемых рецепторов, за исключением CD33. Установлены разнонаправленные эффекты при моно-влиянии различных пептидов (ГП и ГМДП) и rIFN α 2b на экспрессию изучаемых маркеров, экспонированных на поверхности мембран НГ условно-здоровых детей. Показано модулирующее влияние rIFN α 2b на трансформированный fMLP фенотип субпопуляции CD66b⁺CD33⁺CD16⁺CD11b⁺ НГ, способствующее поляризации провоспалительного фенотипа НГ в противовоспалительный.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Нестерова И. В., Колесникова Н. В., Чудилова Г. А., Ломтатидзе Л. В., Ковалева С. В., Евглевский А. А., Нгуен Т. З. Л. Новый взгляд на нейтрофильные гранулоциты: переосмысление старых догм. (Часть 2). Инфекция и иммунитет 2018, 8(1), 7–18. [Nesterova I. V., Kolesnikova N. V., Chudilova G. A., Lomtatidze L. V., Kovaleva S. V., Yevglevsky A. A., Nguyen T. Z. L. A new look at neutrophilic granulocytes: rethinking old dogmas. (Part 2). Infection and immunity 2017, 7(3), 219–230. Russian].
2. Scapini P., Marini O., Tecchio C., Cassatella M. A. Human neutrophils in the saga of cellular heterogeneity: insights and open questions. Immunol. Rev. 2016, 273(1) 48–60.
3. Garley M., Jabłońska E. Heterogeneity among neutrophils. Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz). 2018, 66(1), 21–30.

INFLUENCY OF INFLUENCES OF REGULATORY PEPTIDES AND RECOMBINANT IFN α ON THE PHENOTYPE OF THE SUBSET CD66b⁺CD33⁺CD16⁺CD11b⁺NEUTROFIL GRANULOCYTES *IN VITRO*

© 2019 I. V. Nesterova^{1,2*}, G. A. Chudilova¹, S. V. Kovaleva¹, L. V. Lomtatidze¹, T. V. Rusinova¹, V. A. Tarakanov¹, N. K. Barova¹, V. N. Pavlenko¹

*E-mail: inesterova1@yandex.ru

¹Kuban State Medical University, Krasnodar, Russia;

²Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russia

Received: 14.03.2019. **Accepted:** 26.03.2019

A model of the bacterial process under the influence of fMLP was reproduced in the *in vitro* system, which made it possible to reveal the features of the transformation of CD66b⁺CD33⁺CD16⁺CD11b⁺ neutrophil granulocytes (NG). Multidirectional effects of mono-effects of peptides and rIFN α 2b on the expression of the studied markers of NG in healthy children were identified. The modulating effect of rIFN α 2b on the transformed fMLP phenotype of NG is associated with polarization into an anti-inflammatory phenotype.

Key words: neutrophilic granulocytes, phenotype, subset

Authors:

Nesterova I. V., MD, Professor, Department of Allergology and Immunology, Peoples' Friendship University, Moscow, Russia; Chief Researcher, Central Research Laboratory, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russia. **E-mail:** inesterova1@yandex.ru;

Chudilova G. A., PhD (Biological Sciences), Head of Department, Central Research Laboratory, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russia;

Kovaleva S. V., Ph.D. (Medical Science), Senior Researcher, Central Research Laboratory, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russia;

Lomtatidze L. V., PhD (Biological Sciences), Senior Researcher, Central Research Laboratory, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russia;

Rusinova T. V., Ph.D. (Biological Sciences), Researcher, Central Research Laboratory, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russia;

Tarakanov V. A., MD, Professor, Head of the Department of Surgical Diseases of Childhood, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russia;

Barova N. K., PhD, Assistant of the Department of Surgical Diseases of Childhood, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russia;

Pavlenko V. N., resident, Department of Clinical Immunology, Allergology and Laboratory Diagnostics, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russia.