

## НЕОДНОЗНАЧНОСТЬ ВЛИЯНИЙ РЕГУЛЯТОРНЫХ ПЕПТИДОВ И РЕКОМБИНАНТНОГО IFN $\alpha$ НА ФЕНОТИП СУБПОПУЛЯЦИИ CD66b<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ В СИСТЕМЕ *IN VITRO*

© 2019 г. И. В. Нестерова<sup>1,2\*</sup>, Г. А. Чудилова<sup>1</sup>, С. В. Ковалева<sup>1</sup>,  
Л. В. Ломтатидзе<sup>1</sup>, Т. В. Русинова<sup>1</sup>, В. А. Тараканов<sup>1</sup>,  
Н. К. Барова<sup>1</sup>, В. Н. Павленко<sup>1</sup>

\*E-mail: inesterova1@yandex.ru

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет»  
Минздрава России, Краснодар, Россия

<sup>2</sup>ФГБОУ 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<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> нейтрофильных гранулоцитов (НГ). Выявлены разнонаправленные эффекты моновливания пептидов и rIFN $\alpha$ 2b на экспрессию изучаемых маркеров НГ у условно-здоровых детей. Модулирующее влияние rIFN $\alpha$ 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 $\alpha$ 2b (rIFN $\alpha$ 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<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> НГ в виде усиления экспрессии всех изучаемых рецепторов, за исключением CD33. Установлены разнонаправленные эффекты при моно-влиянии различных пептидов (ГП и ГМДП) и rIFN $\alpha$ 2b на экспрессию изучаемых маркеров, экспонированных на поверхности мембран НГ условно-здоровых детей. Показано модулирующее влияние rIFN $\alpha$ 2b на трансформированный fMLP фенотип субпопуляции CD66b<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> 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 $\alpha$  ON THE PHENOTYPE OF THE SUBSET CD66b<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>NEUTROFIL GRANULOCYTES *IN VITRO***

© 2019 I. V. Nesterova<sup>1,2\*</sup>, G. A. Chudilova<sup>1</sup>, S. V. Kovaleva<sup>1</sup>, L. V. Lomtatidze<sup>1</sup>, T. V. Rusinova<sup>1</sup>, V. A. Tarakanov<sup>1</sup>, N. K. Barova<sup>1</sup>, V. N. Pavlenko<sup>1</sup>

\*E-mail: inesterova1@yandex.ru

<sup>1</sup>Kuban State Medical University, Krasnodar, Russia;

<sup>2</sup>Peoples' 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<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> neutrophil granulocytes (NG). Multidirectional effects of mono-effects of peptides and rIFN $\alpha$ 2b on the expression of the studied markers of NG in healthy children were identified. The modulating effect of rIFN $\alpha$ 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.