

ОРИГИНАЛЬНАЯ СТАТЬЯ

ОСОБЕННОСТИ РЕГУЛЯТОРНЫХ ВЛИЯНИЙ АРГИНИЛ-АЛЬФА-АСПАРТИЛ-ЛИЗИЛ-ВАЛИЛ-ТИРОЗИЛ-АРГИНИНА НА ИНТАКТНЫЙ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО ТРАНСФОРМИРОВАННЫЙ ФЕНОТИП CD62L⁺CD63⁺CD66d⁺ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ

© 2018 г. И. В. Нестерова^{1, 2*}, Нгуен Тхи Зеу Лен¹, С. В. Хайдуков³,
Г. А. Чудилова², Л. В. Ломтатидзе²

E-mail: inesterova1@yandex.ru

¹“Российский университет дружбы народов” Министерства образования и науки России, г. Москва, Россия;

²“Кубанский государственный медицинский университет Минздрава России”, г. Краснодар, Россия;

³ФГБУН “Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова” РАН, г. Москва, Россия

Поступила: 27.11.2017. Принята: 25.12.2017

В эксперименте *in vitro* создана модель трансформированного фенотипа нейтрофильных гранулоцитов (НГ) условно-здоровых лиц, оснащенных рецепторами CD62L, CD63, CD66d, под влиянием N-формил-метионил-лейцил-фенилаланина (fMLP). Описаны особенности трансформации фенотипа нейтрофильных гранулоцитов. В системе *in vitro* исследовано влияние гексапептида аргинил-альфа-аспартил-лизил-валил-тирозил-аргинина на нетрансформированный и трансформированный фенотип НГ. Показано, что fMLP снижает количество нейтрофильных гранулоцитов, экспрессирующих рецептор CD62L, и уменьшает плотность экспрессии молекул CD62L на мембране НГ, оцениваемую по MFI, умеренно повышает плотность экспрессии рецептора CD63, и умеренно повышает количество НГ, несущих CD66d рецептор. При этом гексапептид практически не влияет на количество нетрансформированных НГ, несущих рецепторы CD62L, CD63, CD66d и уровень их экспрессии. В то же время, при одновременной инкубации НГ с fMLP и гексапептидом показано нивелирование эффектов fMLP: повышается количество CD62L⁺НГ и увеличивается плотность экспрессии молекул CD62L, при этом гексапептид не корректировал негативное влияние fMLP на количество CD63⁺НГ и количество CD66d⁺НГ, а также на уровень плотности экспрессии молекул CD63 и CD66d на поверхностной мембране НГ. В целом, полученные результаты демонстрируют классический иммуномодулирующий эффект гексапептида: с одной стороны – отсутствие каких-либо изменений изучаемых рецепторов на нетрансформированных нейтрофильных гранулоцитах под его влиянием, с другой стороны – нивелирование трансформационных изменений фенотипических характеристик НГ, возникших под влиянием fMLP.

Ключевые слова: нейтрофильные гранулоциты, фенотип, регуляторный гексапептид

DOI: 10.7868/S1028722118010033

Адрес: 117513, г. Москва, Ленинский проспект, 123–1. Нестерова Ирина Вадимовна. Тел. 891618773419 (моб.).
E-mail: inesterova1@yandex.ru

Авторы:

Нестерова И.В., д.м.н., профессор, профессор кафедры аллергологии и иммунологии ФГБОУ ВО “Российский университет 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;

Нгуен Тхи Зеу Лен, аспирант кафедры аллергологии и иммунологии ФПК МР Медицинского института ФГБОУ ВО “Российский университет дружбы народов” Министерства образования и науки России”, г. Москва, Россия;

Хайдуков С.В., д.б.н., старший научный сотрудник отдела химической биологии гликанов и липидов ФГБУН “Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова” РАН, г. Москва, Россия;

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;

Ломтатидзе Л.В., к.б.н., старший научный сотрудник отдела клинической и экспериментальной иммунологии и молекулярной биологии ЦНИЛ ФГБОУ ВО “Кубанский государственный медицинский университет Минздрава России”, г. Краснодар, Россия.

ВВЕДЕНИЕ

Нейтрофильные гранулоциты (НГ) — ключевые клетки иммунной системы, участвующие как в чрезвычайно быстрой реализации эффекторных функций противомикробной защиты, так и в регуляции функционирования клеток адаптивного иммунитета. НГ оснащены большим количеством поверхностных мембранных рецепторов, каждый из которых обладает различными индивидуальными свойствами. Функциональная активность НГ зависит от уровня экспрессии различных рецепторов [1–4]. Недавними исследованиями показано существование множества фенотипов НГ с разной рецепторной оснащенностью, различающихся по своим функциональным возможностям, реализуемым в ходе работы. Доказана пластичность НГ: способность одной и той же субпопуляции НГ с определенным фенотипом менять свои свойства в зависимости от различных воздействий. Изменения фенотипа НГ под влиянием микроокружения (острофазные белки, стрессорные и половые гормоны, хемокины, цитокины, бактерии, вирусы, грибы и т.д.) сопряжены с изменениями их функционирования, что нарушает сбалансированное в физиологических условиях состояние иммунной системы [4].

Несомненно большой интерес представляют поверхностные мембранные рецепторы НГ — CD62L, CD63, CD66d. Так, описаны различные варианты трансформации фенотипа CD62L⁺CD63⁺НГ у здоровых новорожденных и при врожденной пневмонии, в том числе осложненной сепсисом: выявлено 3 субпопуляции НГ (CD62L^{dim}CD63^{dim}, CD62L^{bright}CD63^{dim}, CD62L^{dim}CD63^{mid}), показано, что при развитии инфекционного процесса происходит увеличение количества НГ с фенотипом CD62L^{dim}CD63^{mid}, снижение CD62L^{bright}CD63^{dim} НГ, более выраженные при тяжелом течении заболевания [5, 6]. Также установлено, что у больных с гнойным перитонитом в дооперационном периоде в периферической крови повышено содержание CD62L⁺-, HLA-DR⁺- и CD64⁺-НГ. При этом высокий уровень содержания CD62L⁺-НГ сохраняется в течение 24 суток послеоперационного периода, тогда как количество HLA-DR⁺- и CD64⁺-НГ на 24 сутки послеоперационного периода снижается до уровня нормы [7].

Молекулы CD62L экспрессируются почти на всех циркулирующих неактивированных НГ и костномозговых миелоидных клетках.

CD62L — L-селектин [LAM-1] относится к семейству поверхностных селектинов и участвует в “роллинге” НГ на поверхности эндотелия при инициализации воспалительного процесса в иммунном ответе.

Молекула CD63 — лизосомальный мембран ассоциированный гликопротеин-3 (LAMP-3), семейства тетраспанинов (TM4SF, transmembrane-4 superfamily). CD63 и другие тетраспанины (CD9, CD81, CD82) образуют связь с VLA-3, фосфатидилинозитол-4-киназой, VLA-6, CD11/CD18 и тирозин-киназой. CD63 присутствует в альфа-гранулах неактивированных тромбоцитов и экспрессируется на поверхностной мембране активных тромбоцитов, кроме того CD63 также экспрессируется на поверхности и цитоплазме многих клеток организма человека. Поверхностная экспрессия CD63 на НГ связана с лизосомальной секрецией. Известно, что CD63 содержится только в азурофильных гранулах неактивированных нейтрофилов и является маркером. Под влиянием активирующих стимулов экспрессия CD63 на поверхностной мембране НГ значительно повышается. Увеличение уровня экспрессии CD63 сопряжено с процессами фагоцитоза и дегрануляции НГ [8].

НГ экспрессируют несколько раково-эмбриональных антигенов (CEACAM), которые относятся к суперсемейству иммуноглобулинов, являющихся молекулами клеточной адгезии: CD66a, CD66b, CD66d. CD66d участвует в самых разнообразных физиологических и патологических процессах, таких как рак, бактериальная и вирусная инфекции, воспаление, клеточная адгезия и т.д. CD66d (GM-1) — участвует в активации НГ, адгезии и выполняет роль рецептора для некоторых бактерий. Повышение адгезионной активности НГ, опосредованной молекулой CD66d, связывают с увеличением экспрессии CD11/CD18 и снижением экспрессии CD62L на поверхностной мембране НГ. CD66d является эксклюзивным маркером гранулоцитов. Экспрессия CD66d на НГ увеличивается под влиянием многих стимуляторов [9, 10].

Детекция экспрессии рецепторов на мембранной поверхности НГ позволяет не только распознавать фенотип клеток, но и оценивать их функциональное состояние, как при нормальных физиологических, так и при различных патологических условиях. Анализ ранее проведенных исследований позволяет заключить, что ядерный аппарат НГ чутко реагирует на самые различные внешние стимулы

изменением уровня реструктуризации хроматина и своей биологической активности. Реструктуризация хроматина является предпосылкой для появления матричной активности ДНК и последующего белкового синтеза. Показано, что при воздействии на НГ цитокинового окружения (IFN γ , G-CSF, TNF α и др.) в системе *in vitro* активированные и дифференцированные клетки способны менять свой фенотип, при этом происходит достоверное увеличение реструктуризации хроматина НГ. Под влиянием ГМДП и IFN γ повышается уровень экспрессии генов IL-8, IL-1 β и TNF α относительно не индуцированного контроля, что выражается в сильной прямой корреляционной связи между этими показателями и изменением фенотипа нейтрофильных гранулоцитов [11].

В связи с выше изложенным, весьма важными с нашей точки зрения представляются вопросы экспериментального модулирования фенотипов различных субпопуляций НГ и коррекции их дефектной активности. Это позволит в дальнейшем разрабатывать новые методы таргетных иммунотерапевтических воздействий на дефектно функционирующие НГ (дефицит количества НГ, дефектный фагоцитоз, негативные гиперэргические реакции, “парализис” — состояние неответственности при контакте с микробным антигеном) при многих иммунозависимых заболеваниях.

Известно, что гексапептид аргинил-альфа-аспартил-лизил-валил-тирозил-аргинин (ГП) является активным центром гормона тимуса тимопоэтина и обладает определенными иммунорегуляторными свойствами, а также способностью вызывать инактивацию свободно-радикальных и перекисных соединений, восстанавливая баланс окислительно-антиокислительных реакций при инфекционно-воспалительных заболеваниях. В связи с изложенным определенный интерес представляет изучение влияния ГП на трансформированный фенотип НГ.

Цель исследования: разработка экспериментальной модели трансформированного фенотипа CD62L⁺CD63⁺CD66d⁺НГ с последующей оценкой особенностей влияния гексапептида аргинил-альфа-аспартил-лизил-валил-тирозил-аргинина на интактные НГ и НГ условно-здоровых лиц с экспериментально трансформированным фенотипом.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследованы НГ периферической крови 10 условно-здоровых лиц обоего пола в возрасте от 26 до 66 лет. Оценка экспрессии рецепторов на мембране НГ проводилась методом проточной цитометрии с использованием проточного цитофлуориметра FC500 (“Beckman Coulter”, США) и конъюгатов моноклональных антител CD62L-ECD, CD63-FITC, CD66d-PE (“Beckman Coulter International S.A.”, Франция). Оценивали количество НГ (%), экспрессирующих мембранные CD62L, CD63, CD66d рецепторы и интенсивность их экспрессии по MFI (значение интенсивности флуоресценции) [12].

На первом этапе проведена оценка количества интактных НГ, одномоментно экспрессирующих CD62L, CD63, CD66d молекулы с параллельной детекцией интенсивности их экспрессии по MFI, данные параметры в дальнейшем были использованы в качестве контроля. На втором этапе для создания в системе *in vitro* экспериментальной модели трансформированного фенотипа НГ одномоментно экспрессирующего CD62L, CD63, CD66d молекулы (экспериментальная модель 1), использовали N-формил-метионил-лейцил-фенилаланин (fMLP), который является пептидом бактериального происхождения, активатором фагоцитоза и дегрануляции НГ, способствует формированию активных форм кислорода и азота. Образцы цельной крови условно-здоровых лиц инкубировали с fMLP в конечной концентрации 10⁻⁷М, в течение 1 часа, при температуре 37°C. Далее оценивали особенности трансформированного фенотипа НГ. На 3-м этапе оценивали влияние в системе *in vitro* ГП на неизмененный фенотип НГ, экспрессирующих мембранные молекулы CD62L, CD63, CD66d условно-здоровых лиц (экспериментальная модель 2). Образцы цельной крови условно-здоровых лиц инкубировали с ГП в конечной концентрации 10⁻⁶ г/л в течение 1 часа при температуре 37°C. На 4-м этапе оценивали совместное одномоментное влияние fMLP в конечной концентрации 10⁻⁷М и ГП в конечной концентрации 10⁻⁶ г/л на фенотип НГ условно-здоровых лиц, экспрессирующих мембранные CD62L, CD63, CD66d (экспериментальная модель 3). Инкубацию проводили в течение 1 часа при температуре 37°C. Оценка количества НГ (%), одномоментно экспрессирующих CD62L, CD63, CD66d молекулы с параллельной детекцией интенсивности их экспрессии по MFI, была проведена во всех экспериментальных моделях.

Таблица. Особенности экспрессии молекул CD62L, CD63, CD66d на поверхностной мембране интактных НГ и НГ, подвергнутых экспериментальным воздействиям

Фенотип Группы	CD62L		CD63		CD66d	
	% НГ	MFI	% НГ	MFI	%НГ	MFI
Контроль (интактные НГ)	93,1 ± 1,72 [88,7; 95,6]	5,59 ± 1,035 [4,29; 7,57]	99,8 ± 0,21 [99,1; 100,0]	3,14 ± 0,155 [2,81; 3,41]	78,1 ± 3,43 [72,3; 81,4]	2,28 ± 0,107 [2,14; 2,49]
Экспериментальная модель 1 – fMLP	55,8 ± 7,40 [42,1; 70,6] <i>p1*</i>	2,40 ± 0,314 [1,86; 3,08] <i>p1*</i>	99,97 ± 0,05 [99,8; 100,0]	3,52 ± 0,156 [3,23; 3,90] <i>p1*</i>	83,7 ± 2,88 [79,1; 88,1] <i>p1**</i>	2,40 ± 0,116 [2,22; 2,54]
Экспериментальная модель 2 – ГП	94,4 ± 2,0 [90,2; 98,6]	5,12 ± 0,743 [4,15; 6,7] <i>p1**</i>	99,8 ± 0,25 [99,2; 100,0]	3,21 ± 0,148 [3,01; 3,47] <i>p1**</i>	80,4 ± 2,88 [75,4; 87,8]	2,43 ± 0,136 [2,13; 2,63]
Экспериментальная модель 3 – fMLP+ГП	67,3 ± 7,73 [54,9; 76,1] <i>p1*, p2*, p3*</i>	2,83 ± 0,296 [2,31; 3,32] <i>p1*, p2*, p3*</i>	99,97 ± 0,04 [99,9; 100,0] <i>p1**</i>	3,50 ± 0,141 [3,21; 3,7] <i>p1*, p3*</i>	86,7 ± 2,99 [80,8; 91,6]	2,47 ± 0,113 [2,27; 2,65]

Примечание: p1 – достоверность различий между контролем и экспериментальными моделями; p2 – достоверность различий между экспериментальной моделью 1 и моделью 3; p3 – достоверность различий между экспериментальной моделью 2 и моделью 3; M ± m; [min; max]; * $p < 0,01$; ** $p < 0,05$.

Полученные данные были подвергнуты адекватной статистической обработке.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ полученных данных продемонстрировал, что у условно-здоровых лиц количество интактных НГ, несущих рецептор CD62L (CD62L⁺НГ) составило 93,1 ± 1,72% [88,7; 95,6] с плотностью по MFI, равной 5,59 ± 1,035 [4,29; 7,57]. Культивирование образцов периферической крови с fMLP (экспериментальная модель 1) способствовало значительному снижению количества CD62L⁺НГ в 1,67 раза (на 40,1%) с 93,1 ± 1,72% до 55,8 ± 7,40% [42,1; 70,6] ($p < 0,01$), при этом коэффициент регрессии составил 0,5 ± 0,12. Выявлено уменьшение плотности экспрессируемых молекул CD62L на мембране НГ в 2,33 раза – на 57,1%, с 5,59 ± 1,035 [4,29; 7,57] до 2,40 ± 0,314 [1,86; 3,08] ($p < 0,01$), при этом коэффициент регрессии составил 0,4 ± 0,05. Кроме того, под влиянием fMLP умеренно, но достоверно увеличилась плотность экспрессии молекул CD63⁺НГ с 3,14 ± 0,15 [2,81; 3,41] до 3,52 ± 0,15 [3,23; 3,90] ($p < 0,01$), при этом количество CD63⁺НГ было высоким и составило 99,97 ± 0,05, что не отличалось от контроля ($p > 0,05$). Под влиянием fMLP умеренно увеличивалось количество CD66⁺НГ с 78,1 ± 3,43% [72,3; 81,4] до 83,7 ± 2,88% [79,1; 88,1], при этом уровень плотности экспрессируемых молекул CD66d на мембране НГ не изменился (табл., рис.). Данные, полученные в экспериментальной модели 1 *in vitro* по трансформации

изучаемых рецепторов под действием fMLP, соответствуют ранее выявленным изменениям у новорожденных с врожденной пневмонией и пневмонией тяжелого течения, осложненной сепсисом в виде снижения количества CD62L⁺НГ и уровня экспрессии рецептора CD62L на фоне увеличения уровня экспрессии CD63 [5, 6].

В созданной на третьем этапе исследования экспериментальной модели 2 проводилась оценка влияния регуляторного гексапептида ГП на НГ условно-здоровых лиц. Полученные данные продемонстрировали отсутствие позитивных и негативных влияний ГП на количество CD62L⁺НГ, CD63⁺НГ, CD66d⁺НГ и плотность всех экспрессируемых молекул. Количество НГ, экспрессирующих молекулы CD62L, CD63, CD66d, и уровень их экспрессии не изменились по сравнению с контролем (табл.). Таким образом, выявлен иммуномодулирующий эффект ГП, который проявился отсутствием эффектов на нетрансформированный фенотип НГ здоровых лиц.

Оценка одномоментного комбинированного воздействия fMLP и ГП на четвертом этапе исследования (экспериментальная модель 3) позволила установить нивелирование выявленных ранее негативных эффектов fMLP на CD62L⁺НГ. Так, под влиянием ГП значительно увеличилось количество CD62L⁺НГ с 55,8 ± 7,40% [42,1; 70,6] (моновлияние fMLP) до 67,3 ± 7,73% [54,9; 76,1] ($p < 0,01$). Кроме того, умеренно возросла плотность экспрессии молекул CD62L с 2,40 ± 0,314 [1,86; 3,08] до 2,83 ± 0,296 [2,31; 3,32] ($p < 0,01$). Однако, при этом ГП не

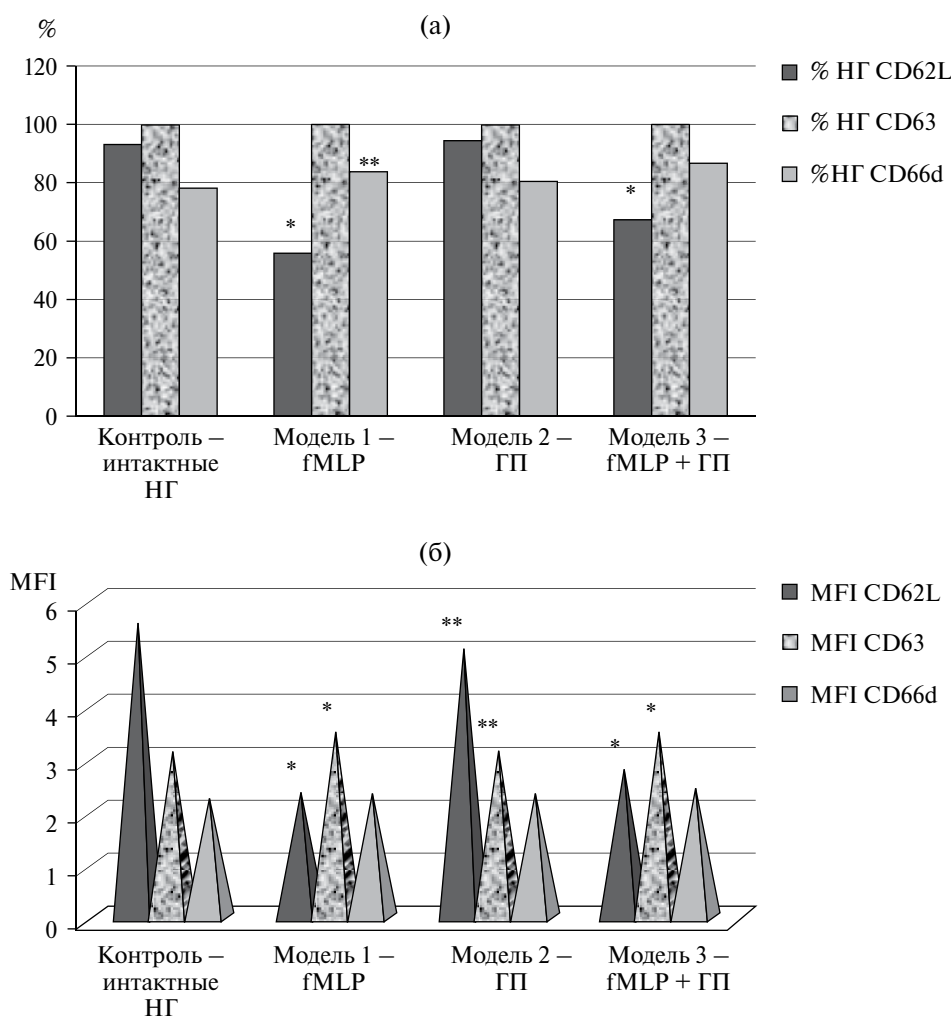


Рис. Динамика изменений относительного содержания (а) и интенсивности оснащения (б) CD62L, CD63, CD66d нейтрофильных гранулоцитов в экспериментах *in vitro*. *Примечание:* * $p < 0,01$; ** $p < 0,05$.

корректировал негативное влияние fMLP на количество CD63⁺НГ и количество CD66d⁺НГ, а также на уровень плотности экспрессии молекул CD63 и CD66d на поверхностной мембране НГ (табл., рис.). Таким образом, выявлен иммуномодулирующий эффект ГП, восстанавливающий трансформационные изменения фенотипических характеристик НГ, вызванные влиянием бактериального пептида, наиболее выраженные в отношении экспрессии CD62L, что важно для полноценного перемещения микрофагоцита к очагу воспаления.

Полученные данные позволяют расширить и углубить понимание роли НГ в иммунном гомеостазе и оценить динамическую взаимосвязь функционального потенциала клетки с её генной экспрессией и синтезом тех или иных факторов, участвующих в иммунологическом “crosstalking”, и фенотипической поляризацией

в ответ на индуцирующие интро- и экстрацеллюлярное окружение.

ВЫВОДЫ

1. Обобщая полученные данные, можно прийти к заключению, что в системе *in vitro* под влиянием бактериального пептида fMLP создана экспериментальная модель трансформированного фенотипа CD62L⁺CD63⁺CD66d⁺НГ.

2. Бактериальный пептид fMLP способствует трансформации фенотипа НГ, влияя в большей степени на количество НГ, экспрессирующих CD62L, и плотность экспрессируемых на поверхностной мембране НГ молекул CD62L.

3. Под влиянием fMLP незначительно повышается уровень экспрессируемых мембранных молекул CD63 и количество CD66d⁺НГ.

4. Полученные результаты демонстрируют классический иммуно-модулирующий эффект ГП, который проявился с одной стороны при его моновоздействии на нетрансформированный фенотип НГ здоровых лиц — отсутствие каких-либо изменений изучаемых рецепторов НГ, и с другой стороны — нивелирование трансформационных изменений фенотипических характеристик НГ, возникших под влиянием бактериального пептида fMLP.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ/REFERENCES

1. Boer K., Vogelsang H., Deufel T., Pfister W., Kiehnthopf M. CD62L on neutrophil granulocytes, a useful, complementary marker for the prediction of ventriculitis in blood-containing CSF. *Clin. Biochem.* 2010, 43 (16–17), 1351–1355. doi:10.1016/j.clinbiochem.2010.07.003.
2. De Jong E., De Lange D.W., Beishuizen A., Van de Ven P.M., Girbes A.R., Huisman A. Neutrophil CD64 expression as a longitudinal biomarker for severe disease and acute infection in critically ill patients. *Int. J. Lab. Hematol.* 2016, 38(5), 576–584. doi: 10.1111/ijlh.12545.
3. 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.
4. 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. *Инфекция и Иммунология* 2017, 7(3), 219–230. doi:10.15789/2220–7619–2017–3–219–230. [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* 2017, 7(3), 219–230.] doi:10.15789/2220–7619–2017–3–219–230
5. Nesterova I.V., Chudilova G.A., Lomtadidze L.V., Kleshchenko E., Kovaleva S., Smerchinskaya T., Sapun O. Three neutrophilic granulocyte's subpopulations CD62L^{dim+}CD63^{dim+}, CD62L^{bright+}CD63^{dim+} and CD62L^{dim+}CD63^{mid+} in newborns with congenital pneumonia. In: *Allergy*, John Wiley & Sons A/S, Barcelona, 2015, 70 (S101), 217.
6. Нестерова И.В., Чудилова Г.А., Ломтатидзе Л.В., Ковалева С.В., Кleshchenko Е.И., Смерчинская Т.В., Сапун О.И. Особенности трансформации экспрессии CD62L, CD63 на мембране нейтрофильных гранулоцитов при врожденной пневмонии у доношенных новорожденных. *Аллергология и иммунология* 2014, 15(3), 219–220. [Nesterova I.V., Chudilova G.A., Lomtadidze L.V., Kovaleva S.V., Kleshchenko E.I., Smerchinskaya T.V., Sapun O.I. Features of transformation of CD62L, CD63 expression on the membrane of neutrophilic granulocytes in congenital pneumonia in term infants. *Allergology and Immunology* 2014, 15 (3), 219–220.]
7. Савченко А.А., Борисов А.Г., Кудрявцев И.В., Гвоздев И.И., Мошев А.В., Черданцев Д.В., Первова О.В. Взаимосвязь фенотипа и метаболизма нейтрофилов крови у больных распространенным гнойным перитонитом в динамике послеоперационного периода. *Инфекция и иммунитет* 2017, 7(3), 259–270. doi: 10.15789/2220–7619–2017–3–259–270. [Savchenko A.A., Borisov A.G., Kudryavtsev I.V., Gvozdev I.I., Moshev A.V., Cherdantsev D.V., Pervova O.V. Interrelation of the phenotype and metabolism of blood neutrophils in patients with advanced purulent peritonitis in the dynamics of the postoperative period. *Infection and immunity* 2017, 7 (3), 259–270. doi: 10.15789 / 2220–7619–2017–3–259–270.]
8. Naegelen I., Beaume N., Plançon S., Schenten V., Tschirhart E.J., Bréhard S. Regulation of neutrophil degranulation and cytokine secretion: a novel model approach based on linear fitting. *J. Immunol. Res.* 2015, 2015, 817038. doi:10.1155/2015/817038.
9. Skubitz K.M., Campbell K.D., Skubitz A.P. Synthetic peptides of CD66a stimulate neutrophil adhesion to endothelial cells. *J Immunol.* 2000, 164(8), 4257–4264. doi: 10.4049/jimmunol.164.8.4257.
10. Skubitz K.M., Campbell K.D., Skubitz A.P. CD66a, CD66b, CD66c, and CD66d each independently stimulate neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* 1996, 60(1), 106–117.
11. Нестерова И.В., Евглевский А.А., Чудилова Г.А., Фомичева Е.В., Ковалева С.В., Ломтатидзе Л.В. Реструктуризация хроматина нейтрофильных гранулоцитов в норме и патологии // под редакцией И.В. Нестеровой и А.А. Евглевского. — М.: Capricorn Publishing, Inc., 2017.— 356 с. doi: 10.17513/NP278. [Nesterova I.V., Evglevsky A.A., Chudilova G.A., Fomicheva E.V., Kovaleva S.V., Lomtadidze L.V. Chromatin restructuring of neutrophilic granulocytes in normal and pathology // edited by I.V. Nesterova and A.A. Evglevsky. Moscow: Capricorn Publishing, Inc., 2017, 356 p doi: 10.17513/ NP278]
12. Нестерова И.В., Чудилова Г.А., Ковалева С.В., Ломтатидзе Л.В., Колесникова Н.В., Евглевский А.А. Методы комплексной оценки функциональной активности нейтрофильных гранулоцитов в норме и патологии (методические рекомендации). Краснодар, 2017, 52 с. [Nesterova I.V., Chudilova G.A., Kovaleva S.V., Lomtadidze L.V., Kolesnikova N.V., Yevlevsky A.A. Methods for the complex evaluation of the functional activity of neutrophilic granulocytes in normal and pathological conditions (methodological recommendations). Krasnodar, 2017, 52 p.]

FEATURES OF THE REGULATORY INFLUENCES OF THE ARGINYL-ALPHA-ASPARTYL-LISYL-TYROSYL-ARGININE ON THE INTACT AND EXPERIMENTAL TRANSFORMED PHENOTYPE CD62L⁺CD63⁺CD66d⁺ OF NEUTROPHILIC GRANULOCYTES

I.V. Nesterova^{1,2*}, Nguyen Thi Dieu Lien¹, S.V. Khajdukov³,
G.A. Chudilova², L.V. Lomtadze²

E-mail: inesterova1@yandex.ru

¹ Federal State Budget Educational Institution of Higher Professional Education "Peoples' Friendship University of Russia" of Ministry of Education and Science of Russia, Moscow, Russia;

² Federal State Budget Educational Institution of Higher Education "Kuban State Medical University" of Ministry of Health Development of Russia, Krasnodar, Russia;

³ Institution of Science "Institute of Bioorganic Chemistry academicians M.M. Shemyakin and Yu.A. Ovchinnikov" of the Academy of Sciences of Russian, Moscow, Russia

Received: 27.11.2017. Accepted: 25.12.2017

The experimental model of the *in vitro* transformed phenotype of neutrophilic granulocytes (NG) equipped with receptors CD62L, CD63, CD66d, was created under the influence of N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP). The features of the transformed phenotype of NG were described. The influence of the hexapeptide arginyl-alpha-aspartyl-lysyl-pyrosyl-arginine on untransformed and transformed phenotype of NG was investigated *in vitro*. It was shown that fMLP reduces the number of NG, expressing the receptor CD62L and reduces the density of expression of this receptor on the surface membrane of NG, moderately increases the density of CD63 and moderately increases the number of CD66d⁺NG. Hexapeptide does not influence on the number of untransformed NG, bearing receptors CD62L, CD63, CD66d, and the level of the expression of those molecules. It has been shown the mitigation of the influences of fMLP after the simultaneous incubation NG with fMLP and hexapeptide: the number of CD62L⁺NG was increased and the density of membrane expression of the molecules of CD62L was increased too. At the same time, hexapeptide did not correct the negative effects of fMLP on the number of CD63⁺NG and CD66d⁺NG, and on level of density of the expression of CD63 and CD66d molecules on the surface membrane of NG. Overall, the results demonstrate the classic immunomodulatory effect of hexapeptide: on the one hand, we saw the absence of any changes of the studying receptors on membrane of the untransformed NG under hexapeptide influences, and on the other hand, it was demonstrated a strong trend of leveling the negative transformational effects of fMLP under hexapeptide influences.

Key words: neutrophilic granulocytes, phenotype, regulatory hexapeptide

Authors:

Nesterova I.V.,  MD (Medicine), 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. 117513, Moscow, Leninsky prospect, 123-1. Phone: 89161877341 (mob.).

E-mail: inesterova1@yandex.ru;

Nguyen Thi Dieu Lien, postgraduate student 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;

Khajdukov S.V., MD (Biological Sciences), Senior Researcher of Department of Chemical Biology of Glycans and Lipids of Federal State Budgetary Institution of Science "Institute of Bioorganic Chemistry academicians M.M. Shemyakin and Yu.A. Ovchinnikov" of the Academy of Sciences of Russian, Moscow, Russia;

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;

Lomtadze L.V., PhD (Biological Sciences), Department of Clinical and Experimental Immunology and Molecular Biology of the 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