

УДК 616.155.34:616—053.2:616—092.4

## ЭФФЕКТЫ ВЛИЯНИЙ РЕКОМБИНАНТНОГО IFN $\alpha$ 2b НА УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ CD16, CD66b, CD33, CD11b РЕЦЕПТОРОВ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ УСЛОВНО-ЗДОРОВЫХ ДЕТЕЙ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ *IN VITRO*

© 2018 г. Г. А. Чудилова<sup>1</sup>, И. В. Нестерова<sup>1,2</sup>, Т. В. Русинова<sup>1</sup>, С. В. Ковалева<sup>1</sup>, Л. В. Ломтатидзе<sup>1</sup>, В. А. Тараканов<sup>1</sup>, В. С. Веревкина<sup>1</sup>, В. Н. Павленко<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>ФГАБОУ ВО «Российский университет дружбы народов» Министерства образования и науки России, Москва, Россия

Поступила: 04.05.2018. Принята: 12.06.2018

Полифункциональность нейтрофильных гранулоцитов (НГ) является результатом богатой экипировки НГ структурами, тонко реагирующими на изменения экстрацеллюлярного окружения и внутриклеточных процессов. В настоящее время идет волна публикаций, отмечающих важность полноценного участия НГ в каскаде иммунологических реакций. При этом авторы отводят ключевую роль именно НГ как при запуске, так и последующей регуляции и реализации иммунного ответа. Показано существование различных популяций НГ, отличающихся по профилю оснащения мембранными антигенами и проявляющих различные функциональные возможности. Целью настоящего исследования явилось изучение влияния рекомбинантного ИФН $\alpha$ 2b (rIFN $\alpha$ 2b) на нетрансформированную и экспериментально трансформированную в системе *in vitro* CD16<sup>+</sup>CD66b<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> субпопуляцию НГ в образцах периферической крови условно-здоровых детей. Уровень экспрессии мембранных рецепторов НГ определяли методом проточной цитометрии. Проведена оценка изучаемых показателей нетрансформированных НГ (контроль) и НГ после инкубации с rIFN $\alpha$ 2b и N-формил-метионил-лейцил-фенилаланином (fMLP). Установлено иммунорегуляторное влияние rIFN $\alpha$ 2b на нетрансформированный фенотип CD16<sup>+</sup>CD66b<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>НГ и иммуномодулирующие эффекты rIFN $\alpha$ 2b в отношении fMLP-трансформированного фенотипа НГ периферической крови условно-здоровых детей.

**Ключевые слова:** нейтрофильные гранулоциты, фенотип, рекомбинантный интерферон

DOI: 10.31857/S102872210002432-0

Адрес: 117513, г. Москва, Ленинский проспект, 123—1; Нестерова Ирина Вадимовна.

Тел.: 8 916 187 73 419; E-mail: inesterova1@yandex.ru;

**Авторы:**

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

**Нестерова И. В.**, д. м. н., профессор кафедры аллергологии и иммунологии, ФГАБОУ ВО «Российский университет дружбы народов» Министерства образования и науки России, Москва, Россия; глав. науч. сотр. отдела клинической и экспериментальной иммунологии и молекулярной биологии ЦНИЛ, ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» МР России, Краснодар, Россия;

**Русинова Т. В.**, к. б. н., научный сотрудник отдела клинико-экспериментальной иммунологии и молекулярной биологии ЦНИЛ, ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» МЗ России, Краснодар, Россия;

**Ковалева С. В.**, к. м. н., доцент, с. н. с. отдела клинико-экспериментальной иммунологии и молекулярной биологии ЦНИЛ, ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» МЗ России, Краснодар, Россия;

**Ломтатидзе Л. В.**, к. б. н., с. н. с. отдела клинической и экспериментальной иммунологии и молекулярной биологии ЦНИЛ, ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» МЗ России, Краснодар, Россия;

**Тараканов В. А.**, д. м. н., профессор, заведующий кафедрой хирургических болезней детского возраста, ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Краснодар, Россия;

**Веревкина В. С.**, аспирант кафедры клинической иммунологии, аллергологии и лабораторной диагностики ФПК и ППС ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» МЗ России, Краснодар, Россия;

**Павленко В. Н.**, ординатор кафедры клинической иммунологии, аллергологии и лабораторной диагностики ФПК и ППС ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» МЗ России, Краснодар, Россия.

## ВВЕДЕНИЕ

Нейтрофильные гранулоциты (НГ) играют доминантную роль в ходе запуска иммунного ответа, выполняя широкий спектр функций от рекрутирования клеток врожденного иммунитета до активации клеток адаптивного иммунитета [1, 2, 3]. Плейотропное действие НГ становится возможным благодаря мощной экипировке клетки рецепторными структурами, тонко реагирующими на изменения внеклеточного микроокружения и интрацеллюлярных процессов. Показано существование различных популяций НГ, отличающихся по профилю оснащения мембранными антигенами [4, 5]. В частности, были идентифицированы популяции НГ, обладающие различной функциональной активностью по отношению к лимфоцитам и способностью к презентации антигенов. Имеются сообщения, демонстрирующие существование НГ, обладающих разной продолжительностью жизни и способностью к направленной миграции. Интересен факт, что даже классическая реакция НГ на *Staphylococcus aureus* не идентична для всех НГ [4]. Много дискуссий вызывает функциональный дуализм НГ, который может проявляться как при неопластических процессах, так и при инфекционно-воспалительных заболеваниях [3, 5]. Мы полагаем, что изучение субпопуляций НГ, проявляющих различную активность в ходе реализации процессов воспаления, может стать объяснением многих, пока неизвестных, иммунопатологических механизмов возникновения как гипо-, так и гиперактивации клетки. Накопление новой информации о различных, иногда и противоречивых, особенностях физиологического или патологического функционирования НГ в дальнейшем может быть использовано в качестве векторного терапевтического инструмента для коррекции различных по своим проявлениям нарушений функционирования НГ.

Поверхностная цитоплазматическая мембрана НГ конститутивно оснащена CD16, CD33, CD66b и CD11b рецепторами, активно участвующими в запуске и регуляции воспалительного процесса [6]. CD33 (Siglec-3 — связывающий сиаловую кислоту Ig-подобный лектин 3, gp67) представляет собой трансмембранный миелоид-специфический рецептор. Внеклеточная часть этого рецептора содержит два домена иммуноглобулина (IgV и IgC2). Внутриклеточная часть CD33 содержит ингибиторные мотивы на основе тирозина (ITIM), которые участвуют в ингибировании клеточной активности [7, 8]. CD33 уча-

ствует в клеточных взаимодействиях и передаче сигналов, а также в регуляции активации лейкоцитов во время воспалительных реакций [9].

CD66b — одноцепочечный гликопротеин с гликозилфосфатидилинозитолом (GPI), экспрессирующийся нейтрофильными и эозинофильными гранулоцитами. CD66b является белком семейства карциноэмбриональных антигенов (CEA) в суперсемействе иммуноглобулинов и обладает двумя Ig-подобными доменами C2-типа и одним Ig-подобным доменом V-типа. В НГ CD66b локализуется внутри гранул в цитоплазме, а также экспрессируется на плазматической мембране с минимальным уровнем, который повышается при индуцированной активации гранулоцитов, и является сигнальным рецептором, участвующим в клеточной адгезии, хемотаксисе, фагоцитозе, агрегации клеток и активности протеинкиназы [10, 11]. Активация CD66b на НГ также способствует секреции IL-8, при этом стимуляция через CD66b не вызывает синтез цитокинов *de novo*, а скорее выброс предварительно образованного IL-8, который образует хемотаксическую дорожку для других клеток. Тем не менее, известно, что при контакте с патогенными стимулами, такими как липополисахарид (LPS) НГ способен синтезировать цитокины *de novo*. Связывание экзогенных или эндогенных углеводных лигандов с CD66b может иметь важное значение для высвобождения провоспалительных медиаторов [12].

CD11b (рецептор 3 компонента комплемента, CR3, Mac-1, интегрин  $\alpha$ M субъединица) с Мм 170 кДа. CD11b экспрессируется миелоидными и естественными киллерными клетками. Этот антиген экспрессируется на миелоцитах и достигает хорошего уровня на дальнейших стадиях дифференцировки. Внутриклеточный пул CD11b сохраняется на мембранах секреторных везикул, желатиназных и специфических гранул. Функционально CD11b регулирует адгезию лейкоцитов и миграцию (только в присутствии субъединицы CD18), чтобы опосредовать воспалительный ответ. CD11b является рецептором для C3bi, опосредующим поглощение частиц с комплементарным покрытием, а также рецептором для гамма-цепи фибриногена, фактора X и ICAM1, участвуя в клеточно-опосредованной цитотоксичности, хемотаксисе и фагоцитозе [13].

CD16 (Fc $\gamma$ RIII) — низкоаффинный рецептор к Fc-фрагменту IgG с Мм 50–80 кДа и имеет 2 трансмембранные формы. Внутри клетки пул

CD16 сохраняется на мембране секреторных гранул. Экспрессия CD16 снижена на поверхностной мембране апоптотических НГ. CD16 способен активировать дегрануляцию, фагоцитоз и окислительный взрыв, что позволяет НГ уничтожать опсонизированные патогены [6, 13, 14]. Известно, что в ходе включения НГ в иммунный ответ, происходит дополнительная транслокация внутриклеточных резервных пулов данных рецепторов на мембрану, что проявляется в многократном приросте количества высоко оснащенных активированных НГ.

Рекомбинантный интерферон альфа-2b (rIFN $\alpha$ 2b) представляет собой высокоочищенный рекомбинантный протеин с Мм 19,3 кДа. Получен из клона *Escherichia coli* путем гибридизации плазмид бактерий с геном человеческих лейкоцитов, кодирующим синтез интерферона. В отличие от интерферона альфа-2a имеет аргинин в положении 23. IFN $\alpha$ 2b обладает выраженной противовирусной активностью. Взаимодействуя со специфическими мембранными рецепторами, IFN $\alpha$ 2b активирует сигнальные внутриклеточные пути, что в конечном итоге ведет к мощной экспрессии генов, ответственных за синтез IFN $\alpha$ / $\beta$ . В результате клетки продуцируют большие количества IFN $\alpha$ / $\beta$ , обладающих прямой и опосредованной противовирусной активностью, противоопухолевыми и иммуномодулирующими свойствами. Кроме того, IFN $\alpha$ / $\beta$  препятствуют нормальной репродукции вируса или его высвобождению из инфицированных клеток, а также блокируют проникновение вирусов в незараженные клетки, реализуя протективный эффект. Иммуномодулирующая активность IFN $\alpha$  в первую очередь связана с его влиянием на экспрессию молекул МНС I класса на всех видах клеток, что способствует распознаванию инфицированных клеток цитотоксическими Т-лимфоцитами (CTL), также стимулирует фагоцитоз и антителозависимую клеточную цитотоксичность моноцитов, макрофагов и нейтрофильных гранулоцитов за счет увеличения числа мембранных Fc-рецепторов. Кроме того, IFN $\alpha$  стимулирует образование антител, синтез и продукцию цитокинов. Работами последних лет показано, что IFN обладают также антибактериальным эффектом, в основе которого лежит способность IFN индуцировать активность некоторых ферментов в пораженной клетке (индоламин-2,3-дезоксигеназу, NO-синтетазу), что способствует разрушению бактериальной клетки или приводит к ее гибели в результате нарушения мета-

болизма [15, 16]. Принимая во внимание приведенные выше факты, определенный интерес представляет изучение влияний рекомбинантного ИФН $\alpha$ 2b (rIFN $\alpha$ 2b) на нетрансформированную и экспериментально трансформированную в системе *in vitro* CD16<sup>+</sup>CD66b<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> субпопуляцию НГ.

**Целью** исследования явилось изучение влияний рекомбинантного ИФН $\alpha$ 2b (rIFN $\alpha$ 2b) на нетрансформированную и экспериментально трансформированную в системе *in vitro* CD16<sup>+</sup>CD66b<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> субпопуляцию НГ в образцах периферической крови условно-здоровых детей.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследовано 80 образцов периферической крови десяти условно-здоровых детей (4 мальчика и 6 девочек) в возрасте от 3 до 5 лет. Особенностью явилось то, что исследуемая группа детей находилась еще в периоде до наступления второго физиологического перекреста (в периферической крови преобладал относительный лимфоцитоз, при этом количество НГ составляло 40,5% [37;42]). У всех законных представителей пациентов 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).

Экспрессию мембранных рецепторов НГ оценивали методом проточной цитометрии (FC500, «Beckman Coulter», США) с использованием конъюгатов МКАТ CD16-ECD, CD66b-FITC, CD33-PE, CD11b-PC5 («Beckman Coulter International S.A.», Франция) по следующим параметрам: количество НГ (%), экспрессирующих изучаемые мембранные рецепторы, интенсивность флуоресценции рецепторов – MFI, отражающая плотность экспрессии каждого рецептора на клеточной мембране. Оценка изучаемых рецепторов по указанным параметрам проведена: 1) на нетрансформированных НГ (полученные данные использовали в качестве контроля); 2) на нетрансформированных НГ после инкубации с rIFN $\alpha$ 2b (в конечной концентрации 10<sup>-6</sup> г/л) (любезно предоставлен ФГУП «Гос.НИИ ОЧБ» ФМБА РФ); 3) на НГ, трансформированных под влиянием N-формил-метионил-лейцил-фенилаланином (fMLP) (в конечной концентрации 10<sup>-7</sup>М); 4) на НГ, трансформированных под влиянием fMLP, с одномоментным внесением

в среду rIFN $\alpha$ 2b. Во всех экспериментах инкубирование проводили в течение 1 часа при температуре 37°C.

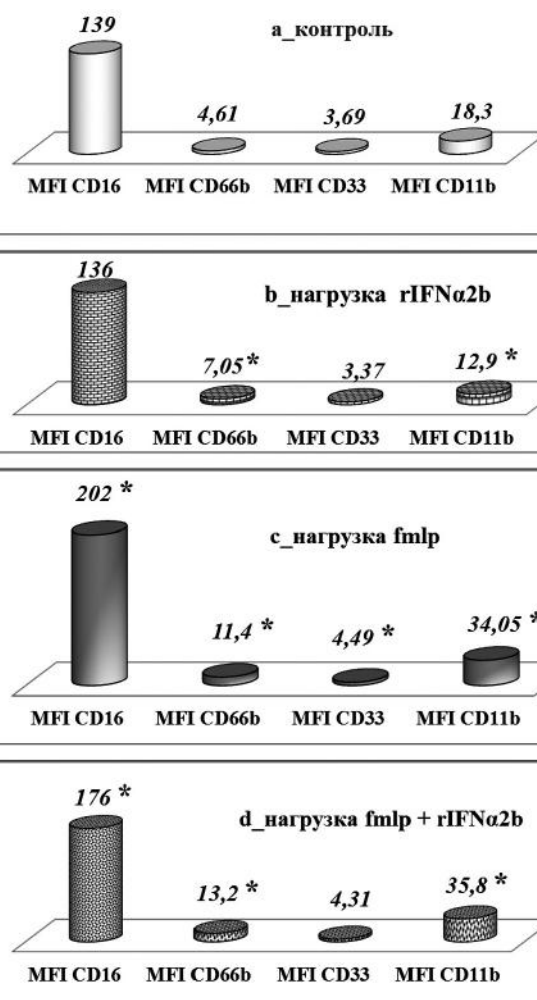
Для создания экспериментальной модели трансформированного фенотипа НГ нами был выбран fMLP, являющийся бактериальным антигеном и обладающий, по мнению разных исследователей, активирующими влияниями на НГ. fMLP, являясь белком многих бактерий, имеет экзогенное происхождение, однако, при этом он имеет и эндогенное происхождение, локализуясь в митохондриях клеток человека. fMLP является одним из мощных хемотаксических факторов НГ, которые связываются с рецепторами клеточной поверхности гетеродимерным G-белком. Показано, что fMLP активирует широкий спектр сигнальных путей, опосредуемых фосфатидинозитол-специфической фосфолипазой C (PLC), фосфолипазой D (PLD), фосфотидилинозитол-3-киназой (PI3K) и митоген-активированными протеинкиназами (МАРК) и индуцирует различные клеточные функции НГ, такие как фагоцитоз, хемотаксис, генерацию активных форм кислорода и высвобождение микробицидных молекул из гранул НГ [17].

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью компьютерных программ Microsoft Excel, StatPlus 2009 с применением непараметрических тестов Вилкоксона и Манна-Уитни. Результаты представляли в виде медианы (верхний и нижний квартиль) (Me[Q1; Q3]). Достоверность различия определяли при  $p < 0,05$ . Исследование одобрено локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО «КубГМУ» Минздрава России.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ полученных данных продемонстрировал, что НГ условно-здоровых детей в 97,03% [94,31; 98,40] одновременно оснащены рецепторами CD16, CD66b, CD33, CD11b с разной плотностью экспрессии (MFI). Так, выявлен высокий уровень интенсивности флюоресценции 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] (Рис. 1а).

Инкубация периферической крови с fMLP приводила к достоверному значительному увеличению плотности экспрессии 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 патогены и повреждения. Представляет



**Рисунок 1.** Изменения значений интенсивности флюоресценции рецепторов (MFI) нетрансформированной и экспериментально трансформированной в системе *in vitro* субпопуляции CD16<sup>+</sup>CD66b<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> НГ в образцах периферической крови условно-здоровых детей.

Примечание: \* –  $p < 0,05$  – достоверность отличия от контроля.

интерес отсутствие активации CD33 рецептора после стимуляции fMLP НГ в контрольной группе, что говорит о рефрактерности к хемотаксическим стимулам для активации этого рецептора в системе *in vitro* (Рис. 1б).

Экспозиция с rIFN $\alpha$ 2b оказала разнонаправленное влияние на экспрессию изучаемых рецепторов. Выявлено достоверное возрастание плотности экспрессии CD66b (в 1,5 раза) и снижение MFI CD11b (в 1,4 раза), тогда как отсутствовали эффекты по отношению к MFI рецепторов CD33 и CD16. Известно, что CD66b участвуют в регуляции адгезии и активации НГ, взаимодействуя с CD11b, с которыми CD66b связан конститутивно [12], но стоит отметить, что полученные эффекты указывают на разные пути

автономной передачи сигналов для экспрессии CD11b и CD66b, что подтверждается данными Schmidt T. et al. [18]. Также можно предположить, что под действием rIFN $\alpha$ 2b НГ реагируют аналогично ответу на вирусную инфекцию: происходит усиление хемотаксических свойств клетки, некоторое торможение запуска фагоцитоза и перепрограммирование НГ на реакцию антителозависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ). Отсутствие эффектов rIFN $\alpha$ 2b в отношении CD16 обусловлено изначально достаточно высоким уровнем его экспрессии у условно-здоровых детей. (Рис. 1с)

В ходе дальнейших экспериментальных исследований было оценено совместное воздействие fMLP и rIFN $\alpha$ 2b (Рис. 1d). Установлено, что уровни экспрессии изучаемых рецепторов были повышены в сравнении со значениями контроля ( $p < 0,05$ ), но достоверно не отличались от показателей активированного профиля НГ под влиянием fMLP, кроме рецептора CD66b. MFI CD66b при совместном влиянии составил 13,2 [12,6; 13,28] и был выше показателей регистрируемых при моно-влиянии как fMLP 11,4 [10,8; 12,8], так и rIFN $\alpha$ 2b 7,05 [5,63; 8,14] ( $p < 0,05$ ). Полученные данные свидетельствуют о способности к тонкому реагированию НГ на стимулы разной природы посредством активации сигнальных молекул и путей, связанных с CD66b (Рис. 2). Обращают на себя внимание выявленные разнонаправлен-

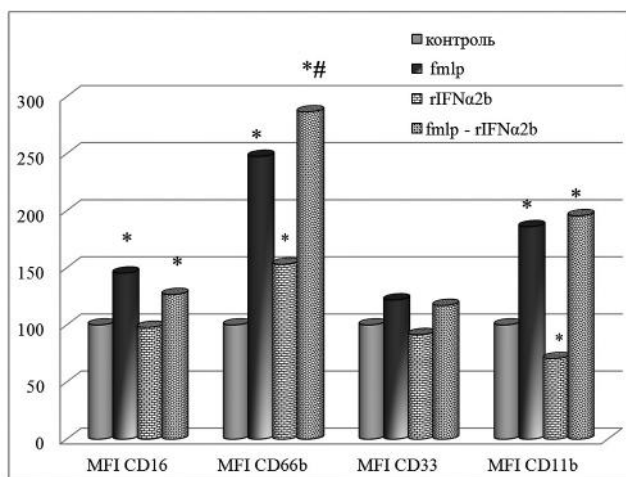
ные регулирующие тенденции влияния rIFN $\alpha$ 2b на трансформированный под воздействием fMLP уровень экспрессии CD16, CD11b, способствующие разрешению воспалительной реакции – поляризации с провоспалительного фенотипа НГ в противовоспалительный. Так, отмечено снижение MFI CD16 до 176 [175; 185,75] ( $p > 0,05$ ) против значений 202 [85,2; 204] при инкубации с fMLP. Тогда как MFI CD11b снижающийся при моновлиянии rIFN $\alpha$ 2b до 12,9 [10,3; 13,7] не менял уровень экспрессии активированный fMLP при сочетанном воздействии fMLP и rIFN $\alpha$ 2b 35,8 [25,7; 37,98].

При формировании иммунного ответа НГ на антигены различной природы, его развитие сопровождается обязательной экспрессией молекул. Важную роль во включении в иммунный ответ НГ и их функциональной активности играют рецепторы CD16, CD66b, CD33, CD11b, обеспечивающие межклеточные взаимодействия и связь с компонентами межклеточного матрикса, образование цитокинов и запуск фагоцитоза. Нами было установлено, что rIFN $\alpha$ 2b оказывает иммунорегуляторное влияние на этот процесс. С одной стороны имеет место увеличение или уменьшение количества экспрессированных на поверхностной мембране НГ изучаемых маркеров при моновлиянии rIFN $\alpha$ 2b на НГ условно-здоровых детей. С другой стороны наблюдается отсутствие активационных эффектов rIFN $\alpha$ 2b на фоне уже активированных НГ условно-здоровых детей раннего возраста в экспериментальной модели бактериального процесса, что расценивается нами как позитивный эффект. Понимание молекулярных механизмов работы той или иной молекулы, включая «молекулу» лекарственного препарата, обеспечивает безопасное его применение в практике. Принимая во внимание полученные экспериментальные данные очевидна целесообразность использования препаратов rIFN $\alpha$ 2b в комплексном лечении бактериальных инфекций, что может позволить получать более высокую эффективность антибактериальной терапии.

## ВЫВОДЫ

1. Установлено, что 97,03% НГ условно-здоровых детей представлены субпопуляцией CD16<sup>+</sup>CD66b<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> с разным уровнем оснащения этими рецепторами.

2. В эксперименте получена трансформация фенотипа CD16<sup>+</sup>CD66b<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>НГ под влиянием fMLP (модель бактериального про-



**Рисунок 2.** Динамика перестройки оснащения НГ в эксперименте системе *in vitro* CD16<sup>+</sup>CD66b<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> субпопуляции НГ периферической крови условно-здоровых детей под влиянием rIFN $\alpha$ 2b (процент от контроля).

*Примечание:* \* –  $p < 0,05$  – достоверность отличия от контроля; # –  $p < 0,05$  – достоверность отличия от fMLP – трансформированного фенотипа.

цесса) в виде усиления экспрессии всех изучаемых рецепторов, за исключением CD33.

3. Полученные результаты показывают регуляторное влияние рекомбинантного ИФН $\alpha$ 2b на нетрансформированный фенотип субпопуляции CD16<sup>+</sup>CD66b<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>НГ и модулирующие эффекты на трансформированный в системе *in vitro* фенотип CD16<sup>+</sup>CD66b<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>НГ здоровых детей раннего возраста, что, по-нашему мнению, способствует ремоделированию провоспалительного фенотипа НГ в противовоспалительный.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. 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. DOI: 10.1111/imr.12448.
2. Kobayashi Y. Neutrophil biology: an update. *EXCLI J.* 2015, 14, 220–227. DOI: 10.17179/excli2015–102.
3. 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 1). *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., Lomtaticidze L. V., Kovaleva S. V., Yevglevsky A. A., Nguyen T. Z. L. A new look at neutrophilic granulocytes: rethinking old dogmas. (Part 1). *Infection and immunity* 2017, 7(3), 219–230. DOI:10.15789/2220–7619–2017–3–219–230. Russian].
4. Garley M., Jabłońska E. Heterogeneity among neutrophils. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)*. 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., 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. DOI: 10.15789/2220–7619–2018–1–7–18. [Nesterova I. V., Kolesnikova N. V., Chudilova G. A., Lomtaticidze 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. DOI: 10.15789/2220–7619–2018–1–7–18. Russian].
6. Elghetany M. Surface antigen changes during normal neutrophilic development: a critical review. *Blood Cells Mol. Dis.* 2002, 28 (2): 260–274. PMID12064921.
7. Garnache-Ottou F., Chaperot L., Biichle S., Ferrand C., Remy-Martin J. P., Deconinck E., de Tailly P. D., Bula-bois B., Poulet J., Kuhlein E., Jacob M. C., Salaun V., Arock M., Drenou B., Schillinger F., Seilles E., Tiberghien P., Bensa J. C., Plumas J., Saas P. Expression of the myeloid-associated marker CD33 is not an exclusive factor for leukemic plasmacytoid dendritic cells. *Blood* 2005, 105(3), 1256–1264. DOI: 10.1182/blood-2004–06–2416.
8. Hernández-Caselles T., Martínez-Esparza M., Pérez-Oliva A. B., Quintanilla-Cecconi A. M., García-Alonso A., Alvarez-López D. M., García-Peñarrubia P. A study of CD33 (SIGLEC-3) antigen expression and function on activated human T and NK cells: two isoforms of CD33 are generated by alternative splicing. *Journal of Leukocyte Biology* 2006, 79(1), 46–58. DOI: 10.1189/jlb.0205096.
9. Crocker P. R., Zhang J. New I-type lectins of the CD33-related siglec subgroup identified through genomics. *Biochemical Society Symposia* 2002, 69; 83–94. DOI: 10.1042/bss0690083.
10. Bandura D. R., Baranov V. I., Ornatsky O. I., Antonov A., Kinach R., Udong Lou X., Pavlov S., Vorobiev S., Dick J. E. Mass cytometry: technique for real time single cell multitarget immunoassay based on inductively coupled plasma time-of-flight mass spectrometry. *Analytical Chemistry* 2009, 81, 6813–6822. DOI: 10.1021/ac901049w.
11. Ornatsky O., Bandura D., Baranov V., Nitz M., Winnik M. A., Tanner S. Highly multiparametric analysis by mass cytometry. *J. Immunol. Methods* 2010, 361(1–2), 1–20. DOI: 10.1016/j.jim.2010.07.002.
12. Schröder A. K., Uciechowski P., Fleischer D., Rink L. Crosslinking of CD66b on peripheral blood neutrophils mediates the release of interleukin-8 from intracellular storage. *Hum. Immunol.* 2006, 67(9), 676–682. DOI: 10.1016/j.humimm.2006.05.004.
13. Mandruzzato S., Brandau S., Britten C. M., Bronte V., Damuzzo V., Gouttefangeas C., Maurer D., Ottensmeier C., van der Burg S. H., Welters M. J., Walter S. Toward harmonized phenotyping of human myeloid-derived suppressor cells by flow cytometry: results from an interim study. *Cancer Immunol. Immunother.* 2016, 65(2), 161–169. DOI: 10.1007/s00262–015–1782–5.
14. Zhang Y., Boesen C. C., Radaev S., Brooks A. G., Fridman W. H., Sautes-Fridman C., Sun P. D. Crystal structure of the extracellular domain of a human Fc $\gamma$ RIII<sup>b</sup>. *Immunity*. 2000, 13 (3), 387–95. DOI:10.1016/S1074–7613(00)00038–8.
15. Нестерова И. В. Препараты интерферона альфа в клинической практике: когда и как. *Лечащий врач* 2017, 9, 66–76. <https://www.lvrach.ru/2017/9/> [Nesterova I. V. Interferon alfa preparations in clinical practice: when and how. *Treatment doctor* 2017, 9, 66–76. <https://www.lvrach.ru/2017/9/>. Russian].
16. Brandacher G., Margreiter D., Fuchs D. Implications of IFN-gamma-mediated tryptophan catabolism on solid organ transplantation. *Curr. Drug Metab.* 2007, 8(3), 273–282. PMID: 17430115.
17. Sato T., Hongu T., Sakamoto M., Funakoshi Y., Kanaho Y. Molecular mechanisms of N-Formyl-Methionyl-leucyl-phenylalanine-induced superoxide generation and degranulation in mouse neutrophils: phospholipase D is dispensable. *Mol. Cell Biol.* 2013, 33(1), 136–145. DOI: 10.1128/MCB.00869–12.
18. Schmidt T., Brodesser A., Schnitzler N., Gröger T., Brandenburg K., Zinserling J., Zündorf J. CD66b overexpression and loss of C5a receptors as surface markers for *Staphylococcus aureus*-induced neutrophil dysfunction. *PLoS ONE* 2015, 10(7), e0132703. DOI: 10.1371/journal.pone.0132703.

**EFFECTS OF INFLUENCES OF RECOMBINANT IFN $\alpha$ 2b ON THE LEVEL OF EXPRESSION OF THE CD16, CD66b, CD33, CD11b RECEPTORS OF NEUTROPHILIC GRANULOCYTES OF CONDITIONALLY HEALTHY CHILDREN IN THE EXPERIMENT *IN VITRO***

© 2018 G. A. Chudilova<sup>1</sup>, I. V. Nesterova<sup>1,2</sup>, T. V. Rusinova<sup>1</sup>, S. V. Kovaleva<sup>1</sup>, L. L. Lomtatzidze<sup>1</sup>, V. A. Tarakanov<sup>1</sup>, V. S. Verevkina<sup>1</sup>, V. N. Pavlenko<sup>1</sup>

<sup>1</sup>FSBEI of Higher Education «Kuban State Medical University» of Ministry of Health Development of Russia, Krasnodar, Russia;

<sup>2</sup>FSBEI of Higher Professional Education «Peoples' Friendship University of Russia» of Ministry of Education and Science of Russia, Moscow, Russia

Received: 04.05.2018. Accepted: 12.06.2018

The polyfunctionality of neutrophilic granulocytes (NG) is the result of the rich equipment of NGs by structures that respond subtly to changes in the extracellular environment and intracellular processes. At the present time there is a wave of publications that note the importance of the full participation of NG in the cascade of immunological reactions. Wherein the authors assign a key role to NG, both at the start-up and subsequent regulation and realization of the immune response. The existence of different populations of NGs differing in the profile of equipping with membrane antigens and exhibiting various functional possibilities is shown. The aim of this study was to study the effects of recombinant IFN $\alpha$ 2b (rIFN $\alpha$ 2b) on a non-transformed and experimentally transformed subpopulation CD16<sup>+</sup>CD66b<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>NG *in vitro* of peripheral blood samples of conditionally healthy children. The expression level of the membrane NG receptors was determined by flow cytometry. The studied indicators of untransformed NG (control) and NG after incubation with rIFN $\alpha$ 2b and N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP) were assessed. The immunoregulatory effect of rIFN $\alpha$ 2b on the nontransformed phenotype CD16<sup>+</sup>CD66b<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>NG and the immunomodulatory effects of rIFN $\alpha$ 2b on the fMLP-transformed NG phenotype of peripheral blood of conditionally healthy children were established.

*Key words:* neutrophilic granulocyte, recombinant rIFN $\alpha$ 2b, phenotype, receptor

**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, FSBEI of Higher Education «Kuban State Medical University» of Ministry of Health Development of Russia, Krasnodar, Russia;

**Nesterova I. V.**, ✉ Doctor of Medical Sciences (MD), Professor, Professor of the Department of Allergology and Immunology, FSBEI of Higher Professional Education «Peoples' Friendship University of Russia» of Ministry of Education and Science of Russia, Moscow; Chief Researcher of Department of Clinical and Experimental Immunology and Molecular Biology of Central Research Laboratory, FSBEI of Higher Education «Kuban State Medical University» of Ministry of Health Development of Russia, Krasnodar, Russia; 117513, Moscow, Leninsky prospect, 123–1. Phone (mob): 8 916 187 73 41, **E-mail:** inesterova1@yandex.ru;

**Rusinova T. V.**, Ph.D. (Biological Sciences), Researcher, Department of Clinical Experimental Immunology and Molecular Biology, FSBEI of Higher Education «Kuban State Medical University» of the Ministry of Health Development of Russia, Krasnodar, Russia;

**Kovaleva S. V.**, Ph.D. (Medical Science), Associate Professor, Senior Researcher, Department of Clinical Experimental Immunology and Molecular Biology, FSBEI of Higher Education «Kuban State Medical University» of the Ministry of Health Development of Russia, Krasnodar, Russia;

**Lomtatzidze L. V.**, PhD (Biological Sciences), Senior Researcher, Department of Clinical and Experimental Immunology and Molecular Biology of the Central Research Laboratory, FSBEI of Higher Education «Kuban State Medical University» of Ministry of Health Development of Russia, Krasnodar, Russia;

**Tarakanov V. A.**, Doctor of Medical Sciences (MD), Professor, Head of the Department of Surgical Diseases of Childhood, FSBEI of Higher Education «Kuban State Medical University» of the Ministry of Health Development of Russia, Krasnodar, Russia;

**Verevkina V. S.**, postgraduate student of the Department of Clinical Immunology, Allergology and Laboratory Diagnostics, FSBEI of Higher Education «Kuban State Medical University» of the Ministry of Health Development of Russia, Krasnodar, Russia;

**Pavlenko V. N.**, resident of the Department of Clinical Immunology, Allergology and Laboratory Diagnostics, FSBEI of Higher Education «Kuban State Medical University» of the Ministry of Health Development of Russia, Krasnodar, Russia.