

ЭФФЕКТЫ ВЛИЯНИЙ АГОНИСТА NOD1 И NOD2 – ПОЛИМУРАМИЛА И АГОНИСТА NOD2 – ГЛЮКОЗАМИНИЛМУРАМИЛДИПЕПТИДА НА ФЕНОТИП СУБПОПУЛЯЦИЙ CD64⁻CD16⁺CD32⁺CD11b⁺, CD16⁺CD62L⁺CD63⁻, CD16⁺CD62L⁺CD63⁺ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ

Нестерова И.В.^{1,2}, Чудилова Г.А.¹, Павленко В.Н.¹, Ковалева С.В.¹, Тараканов В.А.¹, Барова Н.К.¹

¹ ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия

² ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», Москва, Россия

Резюме. Антимикробная активность нейтрофильных гранулоцитов (НГ) основана на эффективном распознавании и устранении микробных патогенов, а также на сложных внутриклеточных сигнальных трансдукторных путях, связывающих эти процессы друг с другом. Дисфункция НГ приводит к возникновению нетипично протекающих инфекционно-воспалительных заболеваний, трудно поддающихся лечению с использованием стандартных приемов, что требует новых векторных подходов, направленных как на восстановление нормального функционирования НГ, так и на преодоление антибиотикорезистентности. Определенный интерес с нашей точки зрения представляет агонист NOD1 и NOD2 – полимурамил и агонист NOD2 – глюкозаминилмурамилдипептид. Целью исследования явилось сравнительное изучение особенностей влияний субстанций агониста NOD1 и NOD2 – полимурамила и агониста NOD2 – глюкозаминилмурамилдипептида на фенотип субпопуляций нейтрофильных гранулоцитов CD64⁻CD16⁺CD32⁺CD11b⁺, CD16⁺CD62L⁺CD63⁻, CD16⁺CD62L⁺CD63⁺ в системе *in vitro*.

Исследовано 64 образца периферической крови (ПК) 8 условно здоровых детей (4 мальчиков и 4 девочек) в возрасте от 3 до 9 лет. Методом проточной цитометрии (FC 500, Beckman Coulter, США) оценивали поверхностные мембранные рецепторы НГ CD64, CD16, CD32, CD11b, CD62L, CD63 с МКАТ (Beckman Coulter International S.A., Франция) по параметрам: количество НГ (%), экспрессируемых рецепторы, плотность экспрессии рецептора по интенсивности флуоресценции (MFI). Оценка проведена: на интактных НГ ПК условно здоровых детей (группа сравнения); после инкубации НГ ПК с пролимурамилом (в концентрации 10⁻⁶ г/л); после инкубации НГ ПК с глюко-

Адрес для переписки:

Нестерова Ирина Вадимовна
ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ
117513, Россия, Москва, Ленинский пр., 123, корп. 1, кв. 593.
Тел.: 8 (916) 187-73-41.
E-mail: inesterova1@yandex.ru

Address for correspondence:

Nesterova Irina V.
Kuban State Medical University
117513, Russian Federation, Moscow, Leninsky ave, 123, bldg 1, apt 593.
Phone: 7 (916) 187-73-41.
E-mail: inesterova1@yandex.ru

Образец цитирования:

И.В. Нестерова, Г.А. Чудилова, В.Н. Павленко, С.В. Ковалева, В.А. Тараканов, Н.К. Барова «Эффекты влияний агониста NOD1 и NOD2 – полимурамила и агониста NOD2 – глюкозаминилмурамилдипептида на фенотип субпопуляций CD64⁻CD16⁺CD32⁺CD11b⁺, CD16⁺CD62L⁺CD63⁻, CD16⁺CD62L⁺CD63⁺ нейтрофильных гранулоцитов» // Российский иммунологический журнал, 2020. Т. 23, № 4. С. 411-418. doi: 10.46235/1028-7221-455-EON
© Нестерова И.В. и соавт., 2020

For citation:

I.V. Nesterova, G.A. Chudilova, V.N. Pavlenko, S.V. Kovaleva, V.A. Tarakanov, N.K. Barova "Effects of NOD1 and NOD2 agonists polymuramyl as well as NOD2 agonist glucosaminylmuramyl dipeptide on phenotype of neutrophil granulocyte CD64⁻CD16⁺CD32⁺CD11b⁺, CD16⁺CD62L⁺CD63⁻, CD16⁺CD62L⁺CD63⁺ subsets", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2020, Vol. 23, no. 4, pp. 411-418. doi: 10.46235/1028-7221-455-EON
DOI: 10.46235/1028-7221-455-EON

заминилмурамилдипептидом (ГМДП) (в концентрации 10^{-6} г/л). Инкубирование проводили в течение 60 минут при температуре 37 °С. Сопоставительный анализ различий в рецепторном оснащении субпопуляций CD64⁻CD16⁺CD32⁺CD11b⁺НГ и CD16⁺CD62L⁺CD63⁻НГ, CD16⁺CD62L⁺CD63⁺НГ свидетельствует о позитивной трансформации активационных характеристик циркулирующих НГ под влиянием субстанций агониста NOD1 и NOD2 – полимурамила и агониста NOD2 – ГМДП. При этом выявлены их сходные эффекты разной степени интенсивности, проявляющиеся в увеличении количества НГ субпопуляции CD16⁺CD62L⁺CD63⁺НГ с повышенным уровнем экспрессии CD16 и сниженным CD62L и различия, проявляющиеся значимым повышением экспрессии поверхностных мембранных молекул CD16 и CD11b субпопуляции CD64⁻CD16⁺CD32⁺CD11b⁺НГ на НГ условно здоровых детей под влиянием полимурамила и повышением экспрессии CD32 поверхностных мембранных молекул под влиянием ГМДП.

Ключевые слова: нейтрофильные гранулоциты, субпопуляции, полимурамил, глюкозаминилмурамилдипептид, агонист NOD1, NOD2

EFFECTS OF NOD1 AND NOD2 AGONISTS POLYMURAMYL AS WELL AS NOD2 AGONIST GLUCOSAMINYLMURAMYLDIPEPTIDE ON PHENOTYPE OF NEUTROPHILE GRANULOCYTE CD64⁻CD16⁺CD32⁺CD11b⁺, CD16⁺CD62L⁺CD63⁻, CD16⁺CD62L⁺CD63⁺ SUBSETS

Nesterova I.V.^{a, b}, Chudilova G.A.^a, Pavlenko V.N.^a, Kovaleva S.V.^a,
Tarakanov V.A.^a, Barova N.K.^a

^a Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

^b Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russian Federation

Abstract. Antimicrobial activity of neutrophilic granulocytes (NG) is based on effective recognition and elimination of microbial pathogens, as well as on complex intracellular signal transduction pathways interconnecting these processes. NG dysfunction leads to emergence of atypical infectious and inflammatory diseases recalcitrant to standard interventions, which requires new vector platforms aimed at restoring normal NG functioning and overcoming antibiotic resistance. Moreover, we emphasize about special interest paid to the NOD1 and NOD2 agonist polymuramyl and NOD2 agonist glucosaminylmuramyldipeptide. Objective of the study was to compare effects triggered by NOD1 and NOD2 agonist polymuramyl and NOD2 agonist glucosaminylmuramyldipeptide on phenotype of neutrophilic granulocyte subsets CD64⁻CD16⁺CD32⁺CD11b⁺, CD16⁺CD62L⁺CD63⁻, CD16⁺CD62L⁺CD63⁺ in the *in vitro* system. 64 samples of peripheral blood (PB) collected from 8 apparently healthy children (4 boys and 4 girls) aged 3 to 9 years were examined by flow cytometry (FC 500, Beckman Coulter, USA) assessing NG surface receptors CD64, CD16, CD32, CD11b, CD62L, CD63 with MonAb (Beckman Coulter International S. A., France) by analyzing NG number (%) expressing receptors examined, density of receptor expression measured as mean fluorescence intensity (MFI). For this, there were assessed intact peripheral blood NG from apparently healthy children (comparison group) as well as those exposed to polymuramyl (PM) (at concentration of 10^{-6} g/l) or glucosaminylmuramyl-dipeptide (GMDP) (at concentration of 10^{-6} g/l) for 60 minutes at 37 °C temperature. Comparative analysis of surface receptor expression was performed on CD64⁻CD16⁺CD32⁺CD11b⁺, CD16⁺CD62L⁺CD63⁻ and CD16⁺CD62L⁺CD63⁺ NG subsets that suggested about positive transformation of activation parameters in circulating NG exposed to NOD1 and NOD2 agonist polymuramyl as well as NOD2 agonist glucosaminylmuramyldipeptide. At the same time, similar effects of varying intensity were revealed manifested as increased count of NG subsets CD16⁺CD62L⁺CD63⁺ bearing increased level of CD16 and reduced CD62L expression, as well as differences uncovered as significantly increased expression of surface membrane molecules CD16 and CD11b in CD64⁻CD16⁺CD32⁺CD11b⁺ NG subset from apparently healthy children exposed to polymuramyl as well as increased surface CD32 expression after incubation with GMDP.

Keywords: neutrophilic granulocytes, subpopulation, polymuramyl, glucosaminilmuramyldipeptide agonist, NOD1, NOD2

Введение

Нейтрофильные гранулоциты (НГ) обеспечивают первую линию защиты от многих микробов, что необходимо для поддержания иммунного гомеостаза, а также для защиты от распространенных инфекций. Дисфункция НГ приводит к возникновению нетипично протекающих инфекционно-воспалительных заболеваний, трудно поддающихся лечению с использованием стандартных приемов в рамках клинических рекомендаций МЗ РФ [1]. С другой стороны, возникновение нетипично протекающих инфекционно-воспалительных заболеваний, трудно поддающихся стандартной терапии, связано с всевозрастающей частотой проявлений антибиотикорезистентности. С нашей точки зрения, решение этих сложных проблем требует разработки новых подходов, направленных как на восстановление нормального функционирования субпопуляций НГ, так и на преодоление антибиотикорезистентности.

В последние 15 лет внимание исследователей привлекает изучение врожденных распознающих NOD1 и NOD2 внутриклеточных рецепторов. NOD-белки – нуклеотид-связывающие олигомеризующие доменные (nucleotide-binding oligomerization domain) белки, которые функционируют в цитоплазме клеток и способны распознавать пептидогликан клеточной стенки фагоцитированных и живых бактерий. Следует подчеркнуть, что в большинстве случаев эти исследования выполнены на моделях *in vitro*. Показано, что NOD1 распознает большое количество грамотрицательных бактерий, в то время как NOD2 распознает как грамотрицательные, так и грамположительные бактерии. Полученные данные свидетельствуют, что NOD1 и NOD2 играют значительную роль в формировании противомикробного иммунного ответа [10].

Мурамилпептиды (МДП) – фрагменты пептидогликана бактериальной стенки, которые взаимодействуют с рецепторами NOD1 и NOD2. NOD1 распознает фрагменты пептидогликана грамотрицательных бактерий, содержащие остаток мезо-диаминопимелиновой кислоты, тогда как NOD2 распознает МДП – минимальный иммунологически активный фрагмент пептидогликана всех бактерий [3, 6].

Данные о присутствии NOD1 и NOD2 в цитоплазме НГ противоречивы. Исследуя NOD1 и NOD2 в цитоплазме НГ здоровых доноров в системе *in vitro*, Anna-Karin Ekman and Lars Olaf Cardell (2010) показали отсутствие NOD1 и присутствие NOD2. Так, в изолированных НГ после их стимуляции лигандом NOD1 – γ -D-glutamyl-meso-diaminopimelic acid – экспрессии NOD1 выявлено не было. При стимуляции НГ лигандом

NOD2 – MurNAc-L-Ala-D-isoGln (МДП) методом ПЦР реального времени, была установлена экспрессия NOD2, которая сопровождалась повышением активности IL-8, снижением экспрессии мембранного CD62 и повышением экспрессии маркера активации НГ мембранного CD11b, усилением миграционной активности [5].

Не так давно получены новые данные, свидетельствующие о присутствии в цитоплазме НГ, как NOD2, так и NOD1 внутриклеточных рецепторов, доказана их роль в формировании нейтрофильных экстрацеллюлярных сетей (NET) при инфицировании тканей пародонта *Fusobacterium nucleatum* [2].

В Российской Федерации разработаны 2 оригинальных фармацевтических препарата на основе мурамилдипептидов: Полимурамил и Ликопид. Полимурамил – препарат природного происхождения, в состав которого входит стандартизованная и полностью охарактеризованная композиция трех мурамилпептидных фрагментов пептидогликана клеточной стенки грамотрицательных бактерий (*Salmonella typhi*). Полимурамил способен воздействовать на две синергичные рецепторно-сигнальные системы (NOD1 и NOD2). Компоненты препарата содержат остаток мезо-диаминопимелиновой кислоты, из-за наличия которой Полимурамил является не только агонистом внутриклеточных рецепторов NOD2, но и лигандом цитозольных рецепторов NOD1 [4].

Другим представителем мурамилдипептидов (МДП) является полусинтетический препарат Ликопид – глюкозаминилмурамилдипептид (ГМДП) – N-ацетилглюкозаминил-N-ацетилмурамил-L-аланин-D-изоглютамин, который входит в состав пептидогликана клеточной стенки всех известных бактерий. Ликопид содержит в высокой концентрации ГМДП и свободен от примесей, которые могут вызвать побочные реакции. ГМДП связывается с внутриклеточным рецептором NOD2, что приводит к активации NOD2-сигнального пути и выработке широкого спектра провоспалительных цитокинов [8]. Таким образом, Полимурамил является мощным агонистом внутриклеточных рецепторов NOD1 и NOD2, тогда как ГМДП активирует только NOD2.

В последние годы активно изучаются субпопуляции НГ и трансформационные особенности их фенотипа при различных иммунозависимых заболеваниях. Особый интерес представляют функционально значимые субпопуляции НГ – CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺, CD16⁺CD62L⁺CD63⁻, CD16⁺CD62L⁺CD63⁺, экспрессирующие рецепторы, отвечающие за эффекторные функции НГ: Fc γ R (CD16, CD32, CD64) – рецепторы к

иммуноглобулину G и CR3 (CD11b) – рецептор к компоненту комплемента. Лигирование этих рецепторов зависит от уровня их экспрессии и может запускать фагоцитоз, антителозависимую клеточную цитотоксичность, дегрануляцию и NETOS. В свою очередь CD62L и CD63 рецепторы регулируют активацию подвижности и адгезии НГ, а также процессы дегрануляции [7, 9]. С негативной трансформацией фенотипа субпопуляций НГ, ассоциированной с нарушением их микробицидной активности, связывают возникновение нетипично протекающих инфекционно-воспалительных заболеваний. С нашей точки зрения, определенный интерес представляет сравнительное изучение эффектов влияния агониста NOD1 и NOD2 – полимурамила и агониста NOD2 – глюкозаминилмурамилдипептида на фенотип функционально значимых субпопуляций НГ, поскольку до настоящего времени в доступной нам литературе такие данные не найдены.

Целью исследования явилось сравнительное изучение особенностей влияния субстанций агониста NOD1 и NOD2 – полимурамила и агониста NOD2 – глюкозаминилмурамилдипептида на фенотип субпопуляций нейтрофильных гранулоцитов CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺, CD16⁺CD62L⁺CD63⁻, CD16⁺CD62L⁺CD63⁺ в системе *in vitro*.

Материалы и методы

Исследовано 64 образца периферической крови (ПК) 8 условно здоровых детей (4 мальчиков и 4 девочек) в возрасте от 3 до 9 лет.

Методом множественной проточной цитометрии (FC 500, Beckman Coulter, США) оценивали уровень экспрессии поверхностных мембранных рецепторов НГ CD64, CD16, CD32, CD11b, CD62L, CD63 с использованием конъюгатов МКАТ CD-64-FITC, CD16-ECD, CD32-PE, CD11b-PC5, CD62L-FITC, CD16-PE, CD63-ECD (Beckman Coulter International S.A., Франция) по следующим параметрам: количество НГ (%), экспрессируемых изучаемые мембранные рецепторы, интенсивность флуоресценции рецепторов – MFI, отражающая плотность экспрессии рецептора на клеточной мембране. Оценка изучаемых рецепторов по указанным параметрам проведена: 1) на интактных НГ ПК условно здоровых детей (группа сравнения); 2) после инкубации НГ ПК с пролимурамилом (ПМ) – фрагментами пептидогликана клеточной стенки грамотрицательных бактерий *Salmonella typhi* штамм Ту-2 №4446 – (в конечной концентрации 10⁻⁶ г/л) 3) после инкубации НГ ПК с глюкозаминилмурамилдипептидом, N-ацетилглюкозаминил-N-ацетилмурамоил-аланил-D-изоглутамином (ГМДП)

(в концентрации 10⁻⁶ г/л). Во всех экспериментах инкубирование проводили в течение 60 минут при температуре 37°C.

У всех законных представителей детей 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).

Статистическую обработку результатов исследования проводили с использованием компьютерных программ Microsoft Excel 2016 и StatPlus 2010. Использовали методы непараметрической статистики: результаты представляли в виде медианы (Me) и интерквартильного размаха (Q_{0,25}–Q_{0,75}). Для установления значимости различий между количественными показателями независимых групп использовали непараметрический U-критерий Манна–Уитни. Статистически значимые различия определяли при $p < 0,05$.

Результаты

Анализ полученных данных продемонстрировал, что НГ ПК условно здоровых детей в 90,55 (94,31; 98,40)% случаев представлены функционально значимой субпопуляцией НГ CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺ с высоким уровнем интенсивности флуоресценции MFI CD16 – 119,0 (102,0–121,0) и MFI CD32 – 8,46 (7,15–8,76) и средний MFI CD11b – 25,3 (21,66–30,43).

Установлено, что ПМ в системе *in vitro* не влияет на количество НГ субпопуляции CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺, содержание которых составляет 92,92 (89,38–96,79) % ($p > 0,05$). В то же время под влиянием ПМ происходит изменение фенотипических характеристик субпопуляции CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺НГ: возрастает плотность экспрессии поверхностного мембранного рецептора CD16 по MFI со 119 (102–121) в группе сравнения до 129 (120–178) в группе исследования 1 ($p < 0,05$); статистически значимо возрастает MFI CD11b – более чем в 2,4 раза, до 54,9 (51,4–55,0) против 25,3 (21,66–30,43) в группе сравнения ($p < 0,05$). При этом плотность экспрессии поверхностного мембранного рецептора CD32 по MFI под влиянием ПМ не изменяется ($p \geq 0,05$) (рис. 1).

Показано, что ГМДП в системе *in vitro* также не влияет на количество НГ субпопуляции CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺, достигая 92,31 (88,73–94,71)% ($p > 0,05$). При этом под влиянием ГМДП иначе изменяются фенотипические характеристики субпопуляции CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺НГ: статистически значимо возрастает только плотность экспрессии поверхностного мембранного рецептора CD32 по MFI

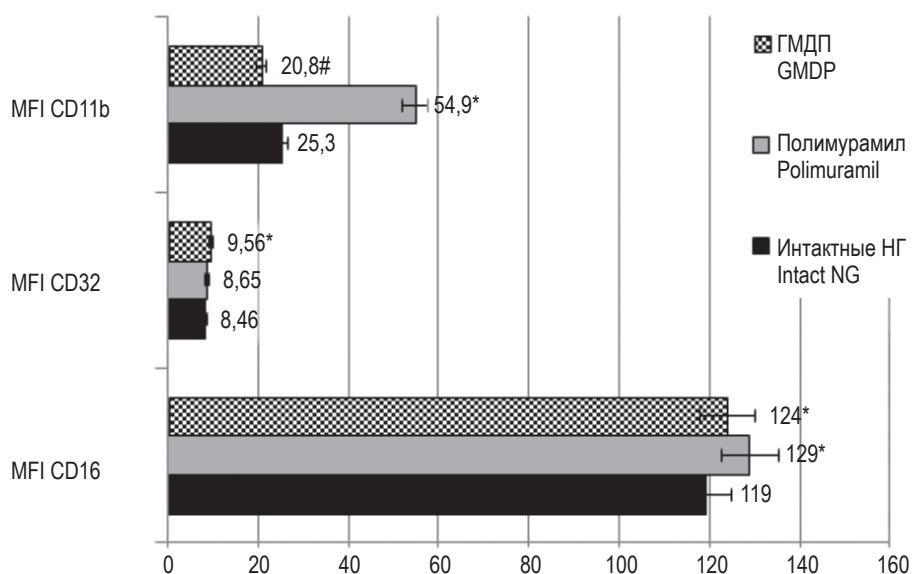


Рисунок 1. Эффекты Полимурамила и ГМДП на фенотип субпопуляции CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺ нейтрофильных гранулоцитов

Примечание. * – значимые различия от показателей группы сравнения (интактные НГ), $p < 0,05$; # – значимые различия между показателями исследуемых групп, $p < 0,05$.

Figure 1. Effects of Polimuramil and GMDP on the phenotype of the CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺ neutrophilic granulocyte subset
Note. *, significant differences from the indicators of the comparison group (intact NG), $p < 0.05$; #, significant differences between the indicators of the studied groups, $p < 0.05$.

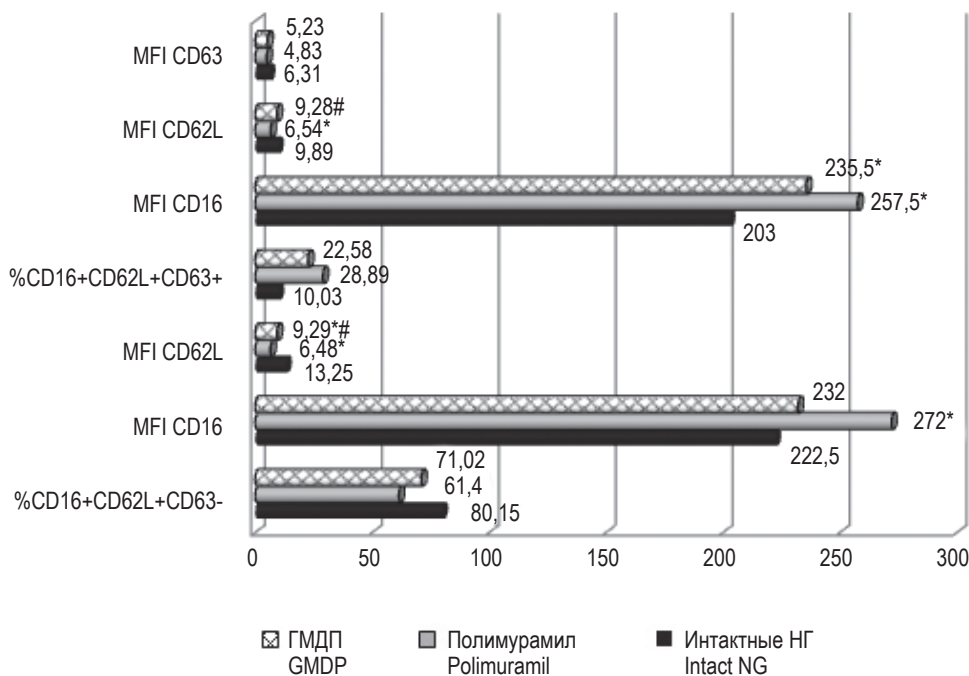


Рисунок 2. Эффекты Полимурамила и ГМДП на количество и фенотип субпопуляций CD16⁺CD62L⁺CD63⁺, CD16⁺CD62L⁺CD63⁻ нейтрофильных гранулоцитов

Примечание. См. примечание к рисунку 1.

Figure 2. Effects of Polimuramil and GMDP on the number and phenotype of subsets CD16⁺CD62L⁺CD63⁺, CD16⁺CD62L⁺CD63⁻ neutrophilic granulocytes

Note. As for Figure 1.

с 8,45 (7,15-8,76) в группе сравнения до 9,56 (8,9-10,3) в группе исследования 2 ($p < 0,05$). При этом плотность экспрессии поверхностных мембранных молекул CD16 и CD11b под влиянием ГМДП значимо не отличается от показателей группы сравнения ($p_1 > 0,05$; $p_2 > 0,05$).

Сравнительный анализ эффектов влияний ПМ и ГМДП продемонстрировал, что ПМ, связываясь с внутриклеточными рецепторами NOD1 и NOD2, статистически значимо повышает экспрессию поверхностных мембранных молекул субпопуляции CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺НГ CD16 и CD11b на НГ условно здоровых детей и не влияет на плотность экспрессии молекулы CD32. В отличие от ПМ, ГМДП, связываясь с внутриклеточным рецептором NOD2, статистически значимо повышает экспрессию поверхностной мембранной молекулы CD32 на НГ субпопуляции CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺НГ и не влияет на плотность экспрессии поверхностных мембранных молекул CD16 и CD11b.

При тестировании фенотипа субпопуляций CD16⁺CD62L⁺CD63⁻, CD16⁺CD62L⁺CD63⁺ в группе сравнения получены следующие данные: выявлено наличие субпопуляций НГ CD16⁺CD62L⁺CD63⁻ в 80,15 (35,52-86,7) % случаев и CD16⁺CD62L⁺CD63⁺ в 10,03 (6,14-59,19) % случаев (рис. 2).

Под влиянием ПМ выявлена тенденция к снижению количества НГ субпопуляции CD16⁺CD62L⁺CD63⁻НГ. Так, количество НГ CD16⁺CD62L⁺CD63⁻НГ снизилось до 61,4 (34,56-81,82) % против такового в группе сравнения – 80,15 (35,52-86,7) % ($p < 0,05$). Отмечена трансформация фенотипических особенностей субпопуляции CD16⁺CD62L⁺CD63⁻НГ: под влиянием ПМ возросла плотность экспрессии поверхностной мембранной молекулы CD16 по MFI – до 272,0 (255-302,75) по сравнению с группой сравнения – 222,5 (192,75-239,5) ($p < 0,05$). В то же время плотность экспрессии CD62L уменьшилась более чем в 2 раза – до 6,48 (6,13-7,53) по отношению к группе сравнения 13,25 (10,8-14,58) ($p < 0,05$).

ГМДП умеренно влиял на количество НГ субпопуляции CD16⁺CD62L⁺CD63⁻НГ, которое снизилось и достигло 71,02 (22,99-75,66) % против такового – 80,15 (35,52-86,7) % в группе сравнения ($p > 0,05$). Отмечены фенотипические особенности трансформации субпопуляции CD16⁺CD62L⁺CD63⁻НГ: под влиянием ГМДП статистически достоверно снизилась плотность экспрессии поверхностной мембранной молекулы CD62L по MFI с 13,25 (10,8-14,58) до воздействия ГМДП до 9,28 (8,9-10,03) после воздействия ($p < 0,05$). При этом плотность экспрессии

поверхностной мембранной молекулы CD16 под влиянием ГМДП не изменялась ($p > 0,05$).

Сравнивая эффекты влияний ПМ и ГМДП, следует подчеркнуть, что ПМ, связываясь с внутриклеточными рецепторами NOD1 и NOD2, статистически значимо изменяет экспрессию поверхностных мембранных молекул CD16 и CD62L субпопуляции CD16⁺CD62L⁺CD63⁻НГ у условно здоровых детей, статистически значимо повышая уровень экспрессии CD16 и снижая уровень экспрессии CD62L ($p_1 < 0,05$; $p_2 < 0,05$). В отличие от ПМ, ГМДП, связываясь с внутриклеточным рецептором NOD2, статистически значимо снижает плотность экспрессируемых молекул CD62L, но в меньшей степени, чем ПМ ($p_1 < 0,05$; $p_2 < 0,05$), и, в отличие от ПМ, не влияет на уровень экспрессии CD16 ($p > 0,05$) (рис. 2).

Под влиянием ПМ выявлена выраженная тенденция к повышению количества НГ субпопуляции CD16⁺CD62L⁺CD63⁺НГ. Так, количество НГ субпопуляции CD16⁺CD62L⁺CD63⁺НГ с 10,03 (6,14-59,19) % в группе сравнения повысилось до 28,89 (15,73-69,65) % ($p > 0,05$). Отмечена трансформация фенотипа субпопуляции CD16⁺CD62L⁺CD63⁺НГ: под влиянием ПМ увеличилась плотность экспрессии поверхностной мембранной молекулы CD16 по MFI – до 257,5 (237-275,75) по сравнению с группой сравнения – 203 (191,25-220) ($p < 0,05$). В то же время плотность экспрессии CD62L статистически значимо уменьшилась до 6,5 (6,26-6,81) по отношению к группе сравнения 9,89 (8,85-11,6) ($p < 0,05$). При этом плотность экспрессии CD63 по MFI под влиянием ПМ не менялась ($p > 0,05$).

ГМДП умеренно повышает количество НГ субпопуляции CD16⁺CD62L⁺CD63⁺НГ, которое достигает 22,58 (16,3-62,65) % против такового в группе сравнения – 10,03 (6,14-59,19) ($p > 0,05$). Отмечена трансформация фенотипа субпопуляции CD16⁺CD62L⁺CD63⁺НГ: под влиянием ГМДП статистически значимо повысилась плотность экспрессии поверхностной мембранной молекулы CD16 по MFI с 203 (191,25-220) до 235,5 (226-247,25) ($p < 0,05$). При этом плотность экспрессии поверхностных мембранных молекул CD62L и CD63 под влиянием ГМДП не менялась ($p_1 > 0,05$; $p_2 > 0,05$).

Сравнивая эффекты влияний ПМ и ГМДП, следует подчеркнуть, что выявлены сходные эффекты их влияний на НГ субпопуляции CD16⁺CD62L⁺CD63⁺НГ, количество которых увеличилось более чем в 2 раза. ПМ, связываясь с внутриклеточными рецепторами NOD1 и NOD2, статистически значимо изменяет экспрессию поверхностных мембранных молекул CD16 и CD62L субпопуляции CD16⁺CD62L⁺CD63⁺ на НГ условно здоровых детей, статистически значи-

мо повышая уровень экспрессии CD16 и снижая уровень экспрессии CD62L ($p_1 < 0,05$; $p_2 < 0,05$). ГМДП, связываясь с внутриклеточным рецептором NOD2, статистически значимо повысил плотность экспрессируемых молекул CD16, но в меньшей степени, чем ПМ ($p_1 < 0,05$; $p_2 < 0,05$), и, в отличие от ПМ, не влиял на уровень экспрессии CD62L ($p > 0,05$). При этом плотность экспрессии CD63 по MFI под влиянием ГМДП также не менялась ($p > 0,05$).

Заключение

Проведенное экспериментальное исследование в системе *in vitro* продемонстрировало неоднозначность дифференцированных эффектов влияний субстанций агониста NOD1 и NOD2 — полимурамила и агониста NOD2 — ГМДП на фенотипические характеристики функционально значимых субпопуляций НГ условно здоровых детей. Сравнительный анализ сходства и различий в фенотипических изменениях субпопуляций CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺НГ и CD16⁺CD62L⁺CD63⁺НГ, CD16⁺CD62L⁺CD63⁺НГ свидетельствует о неоднозначной позитивной трансформации фенотипических характеристик функционально значимых субпопуляций НГ периферической крови условно здоровых детей под влиянием субстанций агониста NOD1 и NOD2 — полимурамила и агониста NOD2 — ГМДП. Сходные эффекты разной степени выраженности проявляются в тенденции к снижению «сторожевой» субпопуляции CD16⁺CD62L⁺CD63⁺НГ, с парал-

лельным увеличением количества НГ активированной субпопуляции CD16⁺CD62L⁺CD63⁺НГ, активация которой сопровождается повышением уровня экспрессии CD16, снижением плотности экспрессии CD62L и появлением большего количества НГ, способных к дегрануляции за счет экспрессии CD63. Установленные различия проявляются в значимом повышении экспрессии поверхностных мембранных молекул CD16 и CD11b субпопуляции CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺НГ у условно здоровых детей под влиянием полимурамила, при отсутствии влияния на экспрессию CD32, в то время как под влиянием ГМДП, наоборот, возникло повышение экспрессии поверхностной мембранной молекулы CD32 при полном отсутствии изменений экспрессии поверхностных мембранных молекул CD16 и CD11b субпопуляции CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺НГ.

Полученные данные о неоднозначных эффектах влияний на функционально значимые субпопуляции НГ условно здоровых детей агониста NOD1 и NOD2 — полимурамила и агониста NOD2 — глюкозаминилмурамилдипептида, свидетельствуют об иммунопротективных эффектах обеих субстанций, повышающих микробицидную активность субпопуляций НГ. При этом направленность иммунопротекции должна напрямую зависеть от негативной трансформации фенотипа функционально-значимых субпопуляций НГ, который может быть ассоциирован с недостаточной экспрессией того или иного активационного маркера.

Список литературы / References

1. 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 (часть 2) // Инфекция и иммунитет, 2018. Т. 8, № 1. С. 7-18. [Nesterova I.V., Kolesnikova N.V., Chudilova G.A., Lomtadidze L.V., Kovaleva S.V., Evlevsky A.A., Nguyen T.Z.L. A new look at neutrophilic granulocytes: rethinking old dogmas (Part 2). *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2018, Vol. 8, no. 1, pp. 7-18. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-2018-1-7-18.
2. Alyami H.M., Finoti L.S., Teixeira H.S., Aljefri A., Kinane D.F., Benakanakere M.R. Role of NOD1/NOD2 receptors in *Fusobacterium nucleatum* mediated NETosis. *Microb. Pathog.*, 2019, Vol. 131, pp. 53-64.
3. Chamaillard M., Hashimoto M., Horie Y., Masumoto J., Qiu S., Saab L., Ogura Y., Kawasaki A., Fukase K., Kusumoto Sh., Valvano M.A., Foster S.J., Mak T.W., Nuñez G., Inohara N. An essential role for NOD1 in host recognition of bacterial peptidoglycan containing diaminopimelic acid. *Nat. Immunol.*, 2003, Vol. 4, no. 7, pp. 702-707.
4. Dagil Y.A., Arbatsky N.P., Pashenkov M.V., Alkhozova B.I., Lvov V.L., Mazurov D.V. The dual NOD1/NOD2 Agonism of muropeptides containing a meso-diaminopimelic acid residue. *PLoS ONE*, 2016, Vol. 11, no. 8, e0160784. doi: 10.1371/journal.pone.0160784.
5. Ekman A.-K., Cardell L.O. The expression and function of Nod-like receptors in neutrophils. *Immunology*, 2010, Vol. 130, no. 1, pp. 55-63.
6. Girardin S.E., Boneca I.G., Viala J., Chamaillard M., Labigne A., Thomas G., Philpott D.J., Sansonetti P.J. Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J. Biol. Chem.*, 2003, Vol. 278, no. 11, pp. 8869-8872.

7. Mastej K., Adamiec R. Neutrophil surface expression of CD11b and CD62L in diabetic microangiopathy. *Acta Diabetol.*, 2008, Vol. 45, no. 3, pp. 183-190.
8. Meshcheryakova E., Makarov E., Philpott D., Andronova T., Ivanov V. Evidence for correlation between the intensities of adjuvant effects and NOD2 activation by monomeric, dimeric and lipophylic derivatives of N-acetylglucosaminy N-acetylmuramyl peptides. *Vaccine*, 2007, Vol. 25, no. 23, pp. 4515-4520.
9. Metelitsa L.S., Gillies S.D., Super M., Shimada H., Reynolds C.P., Seeger R.C. Antidisialoganglioside/ granulocyte macrophage-colony-stimulating factor fusion protein facilitates neutrophil antibody-dependent cellular cytotoxicity and depends on FcγRII (CD32) and Mac-1 (CD11b/CD18) for enhanced effector cell adhesion and azurophil granule exocytosis. *Blood*, 2002, Vol. 99, no. 11, pp. 4166-4173.
10. Moreira L.O., Zamboni D.S. NOD1 and NOD2 signaling in infection and inflammation. *Front. Immunol.*, 2012, Vol. 3, 328. doi: 10.3389/fimmu.2012.00328.

Авторы:

Нестерова И.В. — д.м.н., профессор, главный научный сотрудник отдела клинической и экспериментальной иммунологии и молекулярной биологии Центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар; профессор кафедры аллергологии и иммунологии ФПК МР Медицинского института ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», Москва, Россия

Чудилова Г.А. — к.б.н., доцент, заведующая отделом клинической и экспериментальной иммунологии и молекулярной биологии Центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия

Павленко В.Н. — аспирант кафедры клинической иммунологии, аллергологии и лабораторной диагностики ФПК и ППС ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия

Ковалева С.В. — к.м.н., доцент, старший научный сотрудник отдела клинической и экспериментальной иммунологии и молекулярной биологии Центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия

Тараканов В.А. — д.м.н., профессор, заведующий кафедрой хирургических болезней детского возраста ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия

Барова Н.К. — к.м.н., ассистент кафедры хирургических болезней детского возраста ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия

Authors:

Nesterova I.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Chief Research Associate, Department of Clinical and Experimental Immunology and Molecular Biology, Central Research Laboratory, Kuban State Medical University, Krasnodar; Professor, Department of Allergology and Immunology, Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russian Federation

Chudilova G.A., PhD (Biology), Associate Professor, Head, Department of Clinical and Experimental Immunology and Molecular Biology, Central Research Laboratory, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

Pavlenko V.N., Postgraduate Student, Department of Clinical Immunology, Allergology and Laboratory Diagnostics, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

Kovaleva S.V., PhD (Medicine), Associate Professor, Senior Research Associate, Department of Clinical Experimental Immunology and Molecular Biology, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

Tarakanov V.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Surgical Diseases of Childhood, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

Barova N.K., PhD (Medicine), Assistant Professor, Department of Surgical Diseases of Childhood, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation