

ДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫЕ ВЛИЯНИЯ ГЛЮКОЗАМИНИЛМУРАМИЛДИПЕПТИДА НА НЕТРАНСФОРМИРОВАННЫЙ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО ТРАНСФОРМИРОВАННЫЙ ФЕНОТИП СУБПОПУЛЯЦИИ CD62L⁺CD63⁺CD66d⁺ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ УСЛОВНО ЗДОРОВЫХ ЛИЦ

**Нестерова И.В.^{1,2}, Малиновская В.В.³, Хайдуков С.В.⁴,
Нгуен Тхи Зеу Лен¹, Чудилова Г.А.², Ломтатидзе Л.В.²**

¹ ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» Министерства образования и науки РФ, Москва, Россия

² ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия

³ ГУ «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Н.Ф. Гамалеи Российской академии медицинских наук», Москва, Россия

⁴ ФГБУН «Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова», Москва, Россия

Резюме. Современными исследованиями доказана высокая пластичность и существование множества фенотипов нейтрофильных гранулоцитов (НГ) с разной рецепторной оснащённостью, являющейся для исследователей диагностическим маркером функциональной возможности клетки, реализуемой в ходе работы. Исследованы НГ периферической крови, полученные от здоровых лиц обоего пола в возрасте от 26 до 66 лет. Оценка экспрессии рецепторов на мембране НГ проводилась методом проточной цитометрии. Оценивали относительное количество нейтрофильных гранулоцитов, несущих мембранные CD62L, CD63, CD66d рецепторы, и интенсивность их экспрессии по значению средней интенсивности флуоресценции. Проведено изучение поверхностных мембранных рецепторов НГ – CD62L, CD63, CD66d – под влиянием бактериального пептида N-формил-метионил-лейцил-фенилаланин (fMLP) (модель 1), под воздействием глюкозаминилмурамилдипептида (ГМДП) (модель 2) и при одновременной инкубации НГ цельной крови с fMLP и ГМДП (модель 3) в созданных в системе *in vitro* экспериментальных моделях. Под влиянием бактериального пептида fMLP в созданной в системе *in vitro* экспериментальной модели получена трансформация фенотипа НГ условно здоровых субъектов, экспрессирующих CD62, CD63, CD66d молекулы: значительно уменьшилось

Адрес для переписки:

Нестерова Ирина Вадимовна
ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов»
Министерства образования и науки РФ
117513, Россия, Москва, Ленинский пр., 123-1.
Тел.: 8 (916) 187-73-41.
E-mail: inesterova1@yandex.ru

Address for correspondence:

Nesterova Irina V.
People's Friendship University of Russia
117513, Russian Federation, Moscow, Leninsky ave, 123-1.
Phone: 7 (916) 187-73-41.
E-mail: inesterova1@yandex.ru

Образец цитирования:

И.В. Нестерова, В.В. Малиновская, С.В. Хайдуков, Тхи Зеу Лен Нгуен, Г.А. Чудилова, Л.В. Ломтатидзе «Дифференцированные влияния глюкозаминилмурамилдипептида на нетрансформированный и экспериментально трансформированный фенотип субпопуляции CD62L⁺CD63⁺CD66d⁺ нейтрофильных гранулоцитов условно здоровых лиц» // Медицинская иммунология, 2018. Т. 20, № 6. С. 847-854.
doi: 10.15789/1563-0625-2018-6-847-854

© Нестерова И.В. и соавт., 2018

For citation:

I.V. Nesterova, V.V. Malinovskaya, S.V. Khaydukov, Thi Dieu Lien Nguyen, G.A. Chudilova, L.V. Lomtadidze "Differentiated effects of glucosaminyl muramil dipeptide on the non-transformed and experimentally transformed phenotype of CD62L⁺CD63⁺CD66d⁺ neutrophilic granulocytes in conventionally healthy people", *Medical Immunology (Russia)/Meditinskaya Immunologiya*, 2018, Vol. 20, no. 6, pp. 847-854. doi: 10.15789/1563-0625-2018-6-847-854

DOI: 10.15789/1563-0625-2018-6-847-854

как относительное количество нейтрофильных гранулоцитов, экспрессирующих CD62L, так и плотность экспрессии CD62L с параллельным повышением плотности экспрессии CD63. Воздействие ГМДП на нетрансформированный фенотип НГ условно здоровых субъектов не изменяло количества CD62L⁺НГ и CD63⁺НГ и плотность экспрессии CD62L и CD63 на поверхностной мембране НГ, однако при этом достоверно увеличилось количество CD66d⁺НГ, при неизменившейся плотности экспрессии молекул CD66d. ГМДП, введенный одновременно с бактериальным пептидом fMLP, нивелировал некоторые трансформационные изменения фенотипа НГ, возникающие под влиянием fMLP: незначительно восстановилось количество CD62L⁺НГ и достоверно возросла плотность экспрессии CD62L; при этом ГМДП не корректировал негативное влияние fMLP на количество CD63⁺НГ и CD66d⁺НГ и плотность экспрессии молекул CD63 и CD66d. Одновременное введение fMLP и ГМДП достоверно увеличило количество CD66d⁺НГ и плотность экспрессии молекул CD63 на мембране CD63⁺НГ по сравнению с интактными НГ условно здоровых субъектов. Полученные данные важны для разработки новых иммунотерапевтических стратегий, направленных на коррекцию негативно трансформированного фенотипа НГ при нетипично протекающих инфекционно-воспалительных заболеваниях бактериальной этиологии.

Ключевые слова: нейтрофильные гранулоциты, эксперимент in vitro, трансформация иммунофенотипа

DIFFERENTIATED EFFECTS OF GLUCOSAMINYLMURAMILDIPEPTIDE ON THE NON- TRANSFORMED AND EXPERIMENTALLY TRANSFORMED PHENOTYPE OF CD62L⁺CD63⁺CD66d⁺ NEUTROPHILIC GRANULOCYTES IN CONVENTIONALLY HEALTHY PEOPLE

Nesterova I.V.^{a,b}, Malinovskaya V.V.^c, Khaydukov S.V.^d,
Nguyen Thi Dieu Lien^a, Chudilova G.A.^b, Lomtatidze L.V.^b

^a People's Friendship University of Russia, Moscow, Russian Federation

^b Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

^c N. Gamaleya Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

^d M. Shemyakin and Yu. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Moscow, Russian Federation

Abstract. Modern studies have shown a high plasticity and phenotypic diversity of neutrophilic granulocytes (NG) provided by different receptors, which are diagnostic markers for the functional capacity of the cell in the course of their activities. We investigated NG from peripheral blood, obtained from healthy people of both sexes aged from 26 to 66 years. Evaluation of the neutrophil membrane receptor expression was carried out by flow cytometry. The relative amount of neutrophilic granulocytes expressing membrane CD62L, CD63, CD66d receptors and the intensity of their expression were determined according to their fluorescence intensities. The surface NG membrane receptors, i.e., CD62L, CD63, CD66d were studied upon the *in vitro* experimental influence of the following bacterial peptides: N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP, model 1); glucosaminylmuramyl dipeptide (GMDP, model 2), and simultaneous incubation of NG blood with fMLP and GMDP (model 3). The *in vitro* treatment with fMLP in the *in vitro* model was used to transform the NG phenotype of conventionally healthy subjects, expressing CD62, CD63, CD66d molecules. The treatment caused a significantly decrease in both CD62L and the CD62L expression in relative amounts of neutrophilic granulocytes with a parallel increase of CD63 expression density. The effect of GMDP on the NG phenotype of conditionally healthy subjects did not change the amount of CD62L⁺NG and CD63⁺NG, and did not affect CD62L and CD63 expression density on the surface of NG. However, the amount of CD66d⁺NG was significantly increased with the unchanged expression of CD66d molecules. GMDP introduced together with the bacterial fMLP peptide was shown to neutralize some features of the NG phenotype transformation caused by fMLP, i.e., the amount of CD62L⁺NG was restored by 22 % and the CD62L expression density increased significantly. At the same time, GMDP did not correct the negative effect of fMLP upon the number of CD63⁺NG and CD66d⁺NG, and on the CD63 and CD66d expression. Simultaneous addition of fMLP

and GMDP did significantly increase the amount of CD66d⁺NG and expression density of CD63 molecules on the CD63⁺NG membrane as compared to intact NG of conditionally healthy subjects. The obtained data are important in order to justify some new immunotherapeutic strategies aimed at correction of the negatively transformed NG phenotype, which accompanies some infectious and inflammatory diseases of bacterial etiology with atypical clinical course.

Keywords: neutrophilic granulocytes, in vitro experiment, immunophenotype transformation

Введение

Нейтрофильные гранулоциты (НГ) являются доминантными клетками иммунной системы, которые способны молниеносно реагировать на изменение экстрацеллюлярного микроокружения (острофазные белки, стрессорные половые гормоны, хемокины, цитокины, бактерии, вирусы, грибы и т.д.) благодаря мощному рецепторному оснащению. Очевиден факт, свидетельствующий о том, что богатый арсенал высокочувствительных мембранных поверхностных структур предопределяет функциональную направленность НГ и резервную способность к молниеносной перестройке фенотипов различных субпопуляций НГ в зависимости от инициирующего сигнала [1, 4, 7, 11]. Современными исследованиями доказана высокая пластичность и существование множества фенотипов нейтрофильных гранулоцитов с разной рецепторной оснащенностью, являющейся для исследователей диагностическим маркером функциональной возможности клетки, реализуемой в ходе работы. Отсутствие адекватного реагирования, а также гиперактивация или полная функциональная блокада НГ приводят к развитию заболеваний, не отвечающих на традиционную терапию.

Изучение поверхностных мембранных рецепторов НГ – CD62L, CD63, CD66d – представляет несомненно большой интерес.

CD62L – L-селектин [LAM-1] относится к семейству поверхностных селектинов, участвующих в «роллинге» НГ на поверхности эндотелия. CD62L экспрессируются на всех циркулирующих неактивированных НГ и костномозговых миелоидных клетках. Известно, что при запуске воспалительного процесса в ходе иммунного ответа уровень экспрессии CD62L может меняться [3].

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 экспрессируется на поверхности и цитоплазме многих клеток организма человека. Известно, что CD63 содержится только в азурофильных гранулах неактивированных нейтрофилов, и увеличение уров-

ня экспрессии данного рецептора на мембране клетки свидетельствует о запуске процесса дегрануляции, что в свою очередь является маркером активации НГ в процессе фагоцитоза [9].

CD66d рецептор НГ – молекула клеточной адгезии – раково-эмбриональный антиген, относящийся к суперсемейству иммуноглобулинов (CEACAM). CD66d (GM-1) является эксклюзивным маркером гранулоцитов, экспрессия которого увеличивается под влиянием многих стимуляторов. Известно, что повышение адгезионной активности НГ, опосредованной молекулой CD66d, сопряжена с увеличением экспрессии CD11/CD18 и снижением экспрессии CD62L на поверхностной мембране НГ. Интересен тот факт, что данный рецептор может играть роль паттернраспознающего рецептора для некоторых бактерий [12, 13].

В настоящее время описаны особенности изменения интенсивности оснащения рецепторами CD62L, CD16 субпопуляции CD16⁺CD62L⁺ при вирусных и вирусно-бактериальных инфекциях новорожденных [6] и CD62L, CD63 субпопуляции CD62L⁺CD63⁺НГ здоровых новорожденных и новорожденных с врожденной пневмонией и при пневмонии, осложненной сепсисом [10]. Наши исследования выявили наличие субпопуляций НГ: CD62L^{dim}CD63^{dim}, CD62L^{bright}CD63^{dim}, CD62L^{dim}CD63^{mid}. Изменение соотношения субпопуляций (увеличение CD62L^{dim}CD63^{mid}НГ на фоне снижения CD62L^{bright}CD63^{dim}НГ) является маркером тяжести протекающего инфекционного процесса [10]. Оценка антигенного репертуара НГ с учетом интенсивности экспрессии рецепторов на мембранной поверхности клетки дает возможность оценивать не только полноценность функционального состояния нейтрофильных гранулоцитов, но и их доминантную направленность как при нормальных физиологических, так и при различных патологических процессах. Проведенные ранее исследования позволили заключить, что ядерный аппарат НГ быстро отвечает изменением уровня реструктуризации хроматина и его биологической активности на самые различные внешние стимулы. Реструктуризация хроматина является предверием проявления матричной активности ДНК с последующим белковым синтезом. Так, при воздействии на НГ в эксперименте в системе *in vitro* таких цитокинов,

как $IFN\gamma$, G-CSF, $TNF\alpha$ или их комплекса, наблюдались различные трансформации фенотипа субпопуляций НГ $CD64^+CD32^+CD16^+CD11b^+$ и $CD64^+CD32^+CD16^+CD11b^+$, коррелирующие с достоверным увеличением реструктуризации хроматина НГ [2]. Показано, что при инкубации НГ здоровых субъектов с $IFN\gamma$ *in vitro* повышается уровень экспрессии генов IL-8, IL-1 β и $TNF\alpha$ относительно неиндуцированного контроля. Следует отметить, что в ходе исследования была отмечена сильная прямая корреляционная связь между трансформационными изменениями фенотипа НГ, экспрессией генов цитокинов и уровнем реструктуризации хроматина [2].

Эксперимент *in vitro*, в ходе которого создается модель, предоставляет исследователю неограниченные возможности, поскольку есть тесная связь между действующим причинным фактором и инициируемым процессом. Исследования, проводимые с целью выявления возможностей влияния на клетку определенной иммуотропной субстанции (ИТС), позволяют оценить непосредственное воздействие ИТС на рецепторное оснащение НГ, сопряженное с модуляцией их функциональной активности, и по-прежнему представляют определенный интерес. Полученные в ходе таких исследований данные в дальнейшем могут явиться основой для разработки новых методов таргетных иммунотерапевтических воздействий на дефектно функционирующие НГ (нейтропения, депрессия фагоцитарной функции, негативная гиперактивация, «парализис»-блокада активации при контакте с микробным антигеном) при многих иммунозависимых заболеваниях.

В связи с изложенным определенный интерес представляет изучение влияния глюкозаминилмурамилдипептида (ГМДП) с доказанными иммуотропными свойствами на трансформированный фенотип НГ. ГМДП представляет собой основную структурную единицу пептидогликана клеточной стенки бактерий, который связывается с цитозольными рецепторами NOD2 и YB1, запускает сигналинг, что в конечном итоге приводит к повышению экспрессии генов провоспалительных цитокинов, инициирующих базисную воспалительную реакцию [5]. Известно, что воздействие ГМДП вызывает стимуляцию эффекторных функций фагоцитов (фагоцитоз, синтез активных форм кислорода, активация микробицидных систем, презентация антигенов) [8], тем не менее исследования влияния ГМДП на экспрессию мембранных рецепторов CD62L, CD63, CD66d НГ до настоящего времени не проводилось. Таким образом, создание экспериментальных моделей дисфункций НГ и экспериментальный поиск новых иммуотропных субстанций,

действие которых будет корректировать работу дефектно функционирующих НГ, является, с нашей точки зрения, перспективным направлением и представляет определенный интерес.

Цель исследования — оценить особенности влияния ГМДП на экспериментально трансформированный фенотип НГ условно здоровых лиц, экспрессирующих молекулы CD62L, CD63, CD66d в системе *in vitro*.

Материалы и методы

Исследованы 40 образцов 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 FC 500 (Beckman Coulter, США) и конъюгатов моноклональных антител CD62L-ECD, CD63-FITC, CD66d-PE (Beckman Coulter International S.A., Франция). Оценивали относительное количество НГ (% НГ), экспрессирующих мембранные CD62L, CD63, CD66d рецепторы и интенсивность их экспрессии по MFI (middle fluorescence intensity). Для создания моделей *in vitro* были использованы N-формил-метионил-лейцил-фенилаланин (fMLP) и глюкозаминилмурамилдипептид (ГМДП).

На первом этапе проведена оценка количества интактных НГ, экспрессирующих CD62L, CD63, CD66d молекулы с параллельной детекцией интенсивности их экспрессии по MFI (контрольная группа). На втором этапе для создания в системе *in vitro* экспериментальной модели трансформированного фенотипа НГ, экспрессирующих CD62L, CD63, CD66d молекулы (экспериментальная модель 1), использовали N-формил-метионил-лейцил-фенилаланин (fMLP), который является пептидом бактериального происхождения, активирующим фагоцитоз, дегрануляцию и метаболизм кислородзависимых микробицидных систем НГ. Образцы цельной крови условно здоровых лиц инкубировали с fMLP в конечной концентрации 7×10^{-7} М в течение 1 часа при температуре 37 °С. Далее оценивали особенности трансформированного фенотипа НГ. На третьем этапе оценивали влияние в системе *in vitro* глюкозаминилмурамилдипептида (ГМДП) на неизмененный фенотип НГ, экспрессирующих мембранные молекулы CD62L, CD63, CD66d условно здоровых лиц (экспериментальная модель 2). Образцы цельной крови условно здоровых лиц инкубировали с ГМДП в конечной концентрации 10^{-6} г/л в течение 1 часа при температуре 37 °С. На четвертом этапе оценивали совместное одномоментное влияние fMLP в конечной концентрации 7×10^{-7} М

и ГМДП 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 °С. Оценка относительного количества НГ, экспрессирующих CD62L, CD63, CD66d молекулы на фоне детекции по MFI уровня экспрессии исследуемых рецепторов, была проведена во всех экспериментальных моделях *in vitro*.

Полученные результаты исследования были обработаны при помощи методов вариационной статистики и представлены в виде среднего значения с показателем стандартной ошибки и минимального, максимального значения ($M \pm m$ [min; max]). При анализе количественных признаков оценка достоверности различий между группами проводилась с использованием непараметрического критерия Манна–Уитни. Различия, связи и зависимости считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$. Ввод данных – в таблицах Microsoft Excel 2007. Обработка результатов проводилась с использованием пакета прикладных программ IBM SPSS Statistics 20.

Результаты и обсуждение

Анализ полученных данных показал, что у условно здоровых лиц относительное количество интактных НГ, несущих CD62L, CD63

и CD66d рецепторы, составило: CD62L⁺НГ – $94,19 \pm 0,63$ [92,20; 96,50] с плотностью оснащения по MFI $5,08 \pm 0,24$ [4,29; 6,20]; CD63⁺НГ – $99,83 \pm 0,09$ [99,10; 100,00] с MFI $3,14 \pm 0,06$ [2,81; 3,41]; CD66d⁺НГ – $78,07 \pm 1,54$ [72,30; 81,40] с уровнем экспрессии по MFI $2,29 \pm 0,06$ [2,09; 2,58] (табл. 1).

Культивирование образцов периферической крови с fMLP (экспериментальная модель 1) способствовало значительному снижению относительного количества CD62L⁺НГ в 1,7 раза (на $58,7\%$ – с $94,19 \pm 0,63$ до $55,29 \pm 3,40$) [42,10; 70,60] ($p < 0,01$), коэффициент регрессии составил $0,6 \pm 0,11$. При этом наблюдалось уменьшение плотности данного рецептора на мембране НГ в 2,24 раза (на $44,7\%$) в сравнении с контрольными показателями ($p < 0,01$) (в частности, MFI CD62L составил $2,27 \pm 0,11$ [1,86; 2,70]), коэффициент регрессии был равен $0,4 \pm 0,06$. Кроме того, под влиянием fMLP умеренно, но достоверно увеличилась плотность экспрессии молекул CD63⁺НГ с $3,14 \pm 0,07$ [2,81; 3,41] до $3,52 \pm 0,08$ [3,23; 3,90] ($p < 0,05$), при этом относительное количество CD63⁺НГ не отличалось от контрольных значений. Следует отметить, что инкубация образцов периферической крови с fMLP не привела к достоверному изменению уровня CD66d⁺НГ ($82,54 \pm 1,1$ [78,50; 86,60])

ТАБЛИЦА 1. ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ МОЛЕКУЛ CD62L, CD63, CD66d НА ПОВЕРХНОСТНОЙ МЕМБРАНЕ ИНТАКТНЫХ НГ И НГ, ПОДВЕРГНУТЫХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ ВОЗДЕЙСТВИЯМ

TABLE 1. PECULIARITIES OF THE EXPRESSION OF CD62L, CD63, CD66d MOLECULES ON THE SURFACE MEMBRANE OF INTACT NG AND NG, SUBJECTED TO EXPERIMENTAL INFLUENCE

Фенотип Phenotype Группы Groups	CD62L		CD63		CD66d	
	% НГ % NG	MFI	% НГ % NG	MFI	% НГ % NG	MFI
Контроль (интактные НГ) Control (intact NG)	$94,19 \pm 0,63$ [92,20; 96,50]	$5,08 \pm 0,24$ [4,29; 6,20]	$99,83 \pm 0,09$ [99,10; 100,00]	$3,14 \pm 0,066$ [2,81; 3,41]	$78,07 \pm 1,54$ [72,30; 81,40]	$2,29 \pm 0,06$ [2,09; 2,58]
Экспериментальная модель 1 – fMLP Experimental model 1 – fMLP	$55,29 \pm 3,40$ [42,10; 70,60] p_1^{**}	$2,27 \pm 0,11$ [1,86; 2,70] p_1^{**}	$99,92 \pm 0,05$ [99,50; 100,00]	$3,52 \pm 0,077$ [3,23; 3,90] p_1^*	$82,54 \pm 1,18$ [78,50; 86,60]	$2,40 \pm 0,05$ [2,22; 2,54]
Экспериментальная модель 2 – ГМДП Experimental model 2 – GMDP	$92,68 \pm 0,63$ [90,80; 94,80]	$4,76 \pm 0,31$ [4,01; 5,88]	$99,78 \pm 0,07$ [99,30; 100,00]	$3,21 \pm 0,075$ [3,00; 3,46]	$88,27 \pm 1,48$ [83,90; 92,40] p_1^{**}	$2,38 \pm 0,09$ [2,05; 2,69]
Экспериментальная модель 3 – fMLP + ГМДП Experimental model 3 – fMLP + GMDP	$77,33 \pm 1,98$ [72,30; 84,30] $p_1^{**}, p_2^{**}, p_3^{**}$	$2,79 \pm 0,15$ [2,34; 3,15] $p_1^{**}, p_2^*, p_3^{**}$	$99,92 \pm 0,05$ [99,50; 100,00]	$3,44 \pm 0,068$ [3,23; 3,59] p_1^{**}	$85,69 \pm 1,30$ [80,40; 90,00] p_1^{**}	$2,38 \pm 0,06$ [2,22; 2,64]

Примечание. p_1 – достоверность различий между контролем и экспериментальными моделями; p_2 – достоверность различий между экспериментальной моделью 1 и моделью 3; p_3 – достоверность различий между экспериментальной моделью 2 и моделью 3; * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$.

Note. p_1 , reliability of differences between the control and the experimental models; p_2 , reliability of differences between the experimental model 1 and model 3; p_3 , reliability of differences between the experimental model 2 and model 3; *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$.

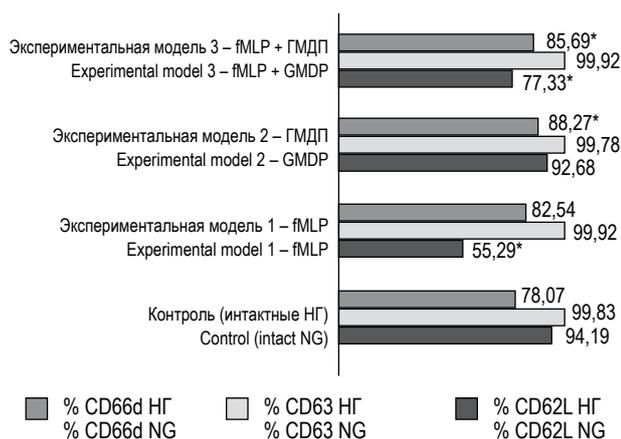


Рисунок 1. Фенотипический профиль нейтрофильных гранулоцитов в экспериментах *in vitro*

Примечание. * – $p < 0,05$ (достоверность различий между контролем и экспериментальными моделями).

Figure 1. Phenotypic profile of neutrophilic granulocytes in experiments *in vitro*

Note. *, $p < 0.05$ (reliability of differences between the control and the experimental models).

и MFI CD66d ($2,4 \pm 0,05$ [2,22; 2,54]) в сравнении с контрольными показателями (рис. 1, 2).

Выявленная динамика перераспределения изучаемых поверхностных мембранных молекул CD62L, CD63, CD66d НГ под воздействием fMLP, полученная в созданной в системе *in vitro* экспериментальной модели 1 по трансформации фенотипа CD62L⁺CD63⁺CD66d⁺НГ, сходна с ранее выявленными нами изменениями экспрессии молекул CD62L и CD63 у новорожденных с врожденной пневмонией и пневмонией тяжелого течения, осложненной сепсисом, в виде снижения относительного количества CD62L⁺CD63⁺НГ и уровня плотности экспрессии CD62L⁺НГ на фоне увеличения уровня экспрессии CD63⁺НГ [10].

В созданной на третьем этапе исследования экспериментальной модели 2 проводилась оценка влияния регуляторного ГМДП на НГ условно здоровых лиц. После инкубации образцов крови с ГМДП наблюдалось умеренное повышение относительного количества НГ (по сравнению с контролем), экспрессирующих CD66d⁺НГ: с $78,07 \pm 1,54$ до $88,27 \pm 1,48$ [83,90; 92,40] ($p < 0,01$), при этом плотность экспрессии этой молекулы была неизменна (табл. 1). Полученные данные продемонстрировали отсутствие позитивных и негативных влияний ГМДП на относительный уровень CD62L⁺НГ, CD63⁺НГ и плотность их экспрессии по сравнению с контролем (рис. 2).

Оценка одномоментного комбинированного воздействия fMLP и ГМДП на четвертом этапе

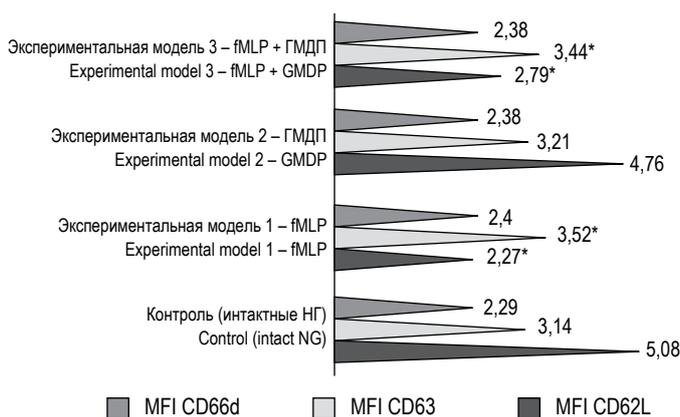


Рисунок 2. Изменение уровня интенсивности оснащения рецепторами CD62L, CD63, CD66d нейтрофильных гранулоцитов в экспериментах *in vitro*

Примечание. * – $p < 0,05$ (достоверность различий между контролем и экспериментальными моделями).

Figure 2. Changing of intensity level equipment receptors CD62L, CD63, CD66d of neutrophilic granulocytes in experiments *in vitro*

Note. *, $p < 0.05$ (reliability of differences between the control and the experimental models).

исследования (экспериментальная модель 3) позволила установить нивелирование выявленных ранее негативных эффектов fMLP на CD62L⁺НГ. Так, под влиянием ГМДП значительно увеличилось количество CD62L⁺НГ с 55,29% (моновлияние fMLP) до $77,33 \pm 1,98$ [72,30; 84,30] ($p < 0,01$) (рис. 1). Кроме того, умеренно возросла плотность экспрессии молекул CD62L с $2,27 \pm 0,11$ [1,86; 2,70] до $2,79 \pm 0,15$ [2,34; 3,15] ($p < 0,05$). Однако при этом ГМДП не корректировал негативное влияние fMLP на относительное количество CD63⁺НГ и CD66d⁺НГ и плотность CD63 и CD66d рецепторов на поверхностной мембране НГ (табл. 1, рис. 2). Следует отметить, что одновременная инкубация НГ с fMLP и ГМДП привела к достоверному приросту относительного количества CD66d⁺НГ ($85,69 \pm 1,30$ против $78,07 \pm 1,54$ в контроле, $p < 0,01$) и достоверному увеличению плотности CD63⁺НГ в сравнении с контролем ($3,44 \pm 0,07$ против $3,14 \pm 0,07$ в контроле, соответственно, $p < 0,01$). Таким образом, выявлен иммуномодулирующий эффект ГМДП – нивелирование негативных трансформационных изменений фенотипических характеристик НГ, которые были вызваны влиянием бактериального пептида fMLP, наиболее выраженные в отношении значимого восстановления количества НГ, экспрессирующих CD62L, и полного восстановления плотности экспрессируемых на мембране НГ CD62L, что, с нашей точки зрения, важно для полноценного перемещения НГ к очагу воспаления.

Выводы

1. Под влиянием бактериального пептида fMLP в созданной в системе *in vitro* экспериментальной модели получена трансформация фенотипа НГ условно здоровых субъектов, одновременно экспрессирующих CD62, CD63, CD66d молекулы: значительно уменьшилось как количество НГ, экспрессирующих CD62L, так и плотность экспрессии CD62L с параллельным повышением плотности экспрессии CD63.

2. Воздействие ГМДП на нетрансформированный фенотип НГ условно здоровых субъектов не изменяло количество CD62L⁺НГ и CD63⁺НГ, не менялась и плотность экспрессии CD62L и CD63 на поверхностной мембране НГ, однако при этом достоверно увеличилось количество CD66d⁺НГ, при неизменившейся плотности экспрессии молекул CD66d.

3. ГМДП, введенный одновременно с бактериальным пептидом fMLP, нивелировал некото-

рые трансформационные изменения фенотипа НГ, возникающие под влиянием fMLP: на 22,04% восстановилось количество CD62L⁺НГ и достоверно возросла плотность экспрессии CD62L; при этом ГМДП не корректировал негативное влияние fMLP на количество CD63⁺НГ и CD66d⁺НГ и плотность экспрессии молекул CD63 и CD66d.

4. Одновременное введение fMLP и ГМДП достоверно увеличило количество CD66d⁺НГ и плотность экспрессии молекул CD63 на мембране CD63⁺НГ по сравнению с интактными НГ условно здоровых субъектов.

5. Полученные данные представляют определенный интерес для разработки новых иммунотерапевтических стратегий, направленных на коррекцию негативно трансформированного фенотипа НГ при нетипично протекающих инфекционно-воспалительных заболеваниях бактериальной этиологии.

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 // Инфекция и иммунитет, 2017. Т. 7, № 3. С. 219-230. [Nesterova I.V., Kolesnikova N.V., Chudilova G.A., Lomtaticze L.V., Kovaleva S.V., Evglevsky A.A., Nguyen T.D.L. A new look at neutrophilic granulocytes: rethinking old dogmas. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2017, Vol. 7, no. 3, pp. 219-230. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-2017-3-219-230.
2. 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 ред. И.В. Нестеровой и А.А. Евглевского. М.: Capricorn Publishing, Inc., 2017. 356 с. [Nesterova I.V., Evglevsky A.A., Chudilova G.A., Fomicheva E.V., Kovaleva S.V., Lomtaticze L.V. Chromatin restructuring of neutrophilic granulocytes in normal and pathology. Ed. by I.V. Nesterova and A.A. Evglevsky. Moscow: Capricorn Publishing, Inc., 2017. 356 p.]
3. 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. Т. 7, № 3. С. 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. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2017, Vol. 7, no. 3, pp. 259-270. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-2017-3-259-270.
4. Boer K., Vogelsang H., Deufel T., Pfister W., Kiehntopf M. CD62L on neutrophil granulocytes, a useful, complementary marker for the prediction of ventriculitis in blood-containing CSF. *Clin. Biochem.*, 2010, Vol. 43, no. 16-17, pp. 1351-1355.
5. Boyle J.P., Parkhouse R., Monie T.P. Insights into the molecular basis of the NOD2 signalling pathway. *Open Biol.*, 2014, Vol. 4, no. 12, pp. 140-178.
6. Cortjens B., Ingelse S.A., Calis J.C., Valar A.P., Koendetman L., Bem R.A., van Woensel J.B. Neutrophil subset responses in infants with severe viral respiratory infection. *Clin. Immunol.*, 2017, Vol. 176, pp. 100-106.
7. 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, Vol. 38, no. 5, pp. 576-584.
8. Laman A.G., Lathe R., Shepelyakovskaya A.O., Gartseva A., Brovko F.A., Guryanova S., Alekseeva L., Meshcheryakova E.A., Ivanov V.T. Muramyl peptides activate innate immunity conjointly via YB1 and NOD2. *Innate Immunity*, 2016, Vol. 22, no. 8, pp. 1-8.
9. Naegelen I., Beaume N., Plançon S., Schenten V., Tschirhart E.J., Brécharde S. Regulation of neutrophil degranulation and cytokine secretion: a novel model approach based on linear fitting. *J. Immunol. Res.*, 2015, Vol. 2015, 817038. doi:10.1155/2015/817038.

10. Nesterova I.V., Chudilova G.A., Lomtatidze L.V., Kleschenko 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, Suppl. S101, p. 217.
11. Qian W., Huang G.Z. Neutrophil CD64 as a marker of bacterial infection in acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Immunol. Invest.*, 2016, Vol. 45, no. 6, pp. 490-503.
12. Skubitz K.M., Campbell K.D., Skubitz A.P. CD66a, CD66b, CD66c, and CD66d each independently stimulate neutrophils. *J. Leukoc. Biol.*, 1996, Vol. 60, no. 1, pp. 106-117.
13. Skubitz K.M., Campbell K.D., Skubitz A.P. Synthetic peptides of CD66a stimulate neutrophil adhesion to endothelial cells. *J. Immunol.*, 2000, Vol. 164, no. 8, pp. 4257-4264.

Авторы:

Нестерова И.В. — д.м.н., профессор, профессор кафедры аллергологии и иммунологии ФПК МР Медицинского института ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» Министерства образования и науки РФ, Москва; 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, Россия

Малиновская В.В. — д.б.н., профессор, руководитель лаборатории онтогенеза и коррекции системы интерферона ГУ «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Н.Ф. Гамалеи Российской академии медицинских наук», Москва, Россия

Хайдуков С.В. — д.б.н., старший научный сотрудник отдела химической биологии гликанов и липидов ФГБУН «Институт биоорганической химии имени академика М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова», Москва, Россия

Нгуен Тхи Зеу Лен — аспирант кафедры аллергологии и иммунологии ФПК МР Медицинского института ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» Министерства образования и науки РФ, 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

Ломтатидзе Л.В. — к.б.н., 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

Authors:

Nesterova I.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Allergology and Immunology at the Medical Institute, People's Friendship University of Russia, Moscow; Chief Research Associate, Central Research Laboratory, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

Malinovskaya V.V., PhD, MD (Biology), Professor, Head, Laboratory of Ontogenesis and Correction of Interferon System, N. Gamaleya Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

Khaydukov S.V., PhD, MD (Biology), Senior Research Associate, Department of Chemical Biology of Glycans and Lipids, M. Shemyakin and Yu. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Moscow, Russian Federation

Nguyen Thi Dieu Lien, Postgraduate Student, Department of Allergology and Immunology, People's 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

Lomtatidze L.V., PhD (Biology), Senior Research Associate, Department of Clinical and Experimental Immunology and Molecular Biology, Central Research Laboratory, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation