

НГУЕН ТХИ ЗЕУ ЛЕН

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ РЕМОДЕЛИРОВАНИЕ
НЕГАТИВНО ТРАНСФОРМИРОВАННОГО ФЕНОТИПА
НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ ПРИ ХРОНИЧЕСКИХ
ГЕРПЕС-ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЯХ**

14.03.09 – Клиническая иммунология, аллергология

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Москва, 2019

Работа выполнена в Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Российский университет дружбы народов»

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор, профессор кафедры аллергологии и иммунологии ФНМО Медицинского института ФГАОУ ВО «РУДН» **Нестерова Ирина Вадимовна**

Официальные оппоненты:

Савочкина Альбина Юрьевна, доктор медицинских наук, профессор кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии и клинической лабораторной диагностики, главный научный сотрудник «НИИ иммунологии» ФГБОУ ВО «Южно-уральский государственный медицинский университет МЗ РФ.

Калюжин Олег Витальевич, доктор медицинских наук, профессор, профессор кафедры клинической иммунологии и аллергологии ФГАОУ ВО «Первый московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» МЗ РФ.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение ГНЦ «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства РФ (ФГБУ ГНЦ «Институт иммунологии» ФМБА РФ).

Защита диссертации состоится «_____» _____ 2019г. в _____ часов на заседании диссертационного совета ПДС 0300.002 при ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» (РУДН) Минобрнауки РФ по адресу: 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д.8/2, каб.249.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке и на сайте ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» Минобрнауки РФ по адресу: 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д.6 и на сайте <http://dissovet.rudn.ru>.

Автореферат разослан «_____» _____ 2019г.

Ученый секретарь

Диссертационного совета ПДС 0300.002,

кандидат медицинских наук, доцент

Баткаева Надежда Владимировна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность и современное состояние проблемы. По данным ВОЗ более 95% взрослого населения Земного шара заражено моно- или микст герпес-вирусными инфекциями. Несмотря на то, что однажды попав в организм человека вирусы полностью не элиминируются, а остаются в нем навсегда, большинство инфицированных людей редко болеет хроническими герпес-вирусными инфекциями (ХГВИ) [Исакова В.А., 2015; Chijioke O., 2013]. Нарушения функционирования противовирусных защитных механизмов иммунной системы – особая проблема для здоровья человека, инфицированного герпес-вирусами. Многочисленными исследованиями ранее показано, что наиболее часто при хронических моно- или микст- герпес-вирусных инфекциях, вызываемых ВЭБ, ЦМВ, ВЧГ6, ВПГ1, ВПГ2, ВОЛ, имеют место нарушения противовирусной иммунной защиты и дефектная работа системы интерферонов [Нестерова И.В., 2018; Lunemann A., 2015; Zhang J., 2017; Arai A., 2018; Nailwal H., 2018].

В последние годы многие исследователи относят НГ к ключевым регуляторным клеткам иммунной системы, способным регулировать работу врожденного и адаптивного иммунитета [Долгушин И.И., 2014; Нестерова И.В., 2018; Mantovani A., 2011; Scapini P., 2014; Geerdink R.J., 2015]. Убедительно доказана роль НГ в противовирусной защите, особенно при ранних контактах НГ с вирусами: фагоцитоз, формирование NETs, экзосом, реализация антителозависимой цитотоксичности, позитивная и негативная регуляция активности Т- и В-лимфоцитов, экспрессия рецепторов и т.д. Функциональная активность НГ зависит от уровня экспрессии различных рецепторов [Сепиашвили Р.И., 2015; Нестерова И.В., 2018]. Показано, что существуют многочисленные субпопуляции НГ, характеризующиеся различным фенотипом и обладающие разными свойствами. Субпопуляции НГ обладают определенной пластичностью, которая позволяет НГ менять свой фенотип и свойства, что напрямую зависит от влияния микроокружения (хемокины, цитокины, ростовые факторы, бактерии, вирусы и т.д) [Долгушин И.И., 2014; Нестерова И.В., 2015-2018; Хаитов Р.М., 2017; Pillay J., 2012; Galani I.E., 2015; Geerdink R. J., 2015; Sagiv J.Y., 2015; Cortjens B., 2017].

В тоже время многими авторами показано, что с одной стороны НГ способны осуществлять мощную противовирусную защиту, с другой стороны – многие вирусы способны негативно влиять на функции НГ, трансформировать фенотип их субпопуляций, усиливать апоптоз, что приводит к нейтропении, депрессии их функции, блокаде противобактериальной фагоцитарной активности и т.д. [Allen K. C., 2013; Geerdink R. J., 2015; Kobayashi S.D., 2018]. При вирусных инфекциях происходит негативная трансформация фенотипа НГ, нарушения их фагоцитарной и регуляторной функций [Нестерова И. В., 2018; Pang G., 2000; Galli S.J., 2011; Allen K. C., 2013; Kobayashi S.D., 2018; Lelifeld P.H.C., 2018; Nesterova I.V., 2019].

В тоже время исследований, посвященных изменениям фенотипа различных функционально значимых субпопуляций НГ при хронических герпес-вирусных инфекциях до настоящего времени не проводилось. Малоизученными остаются вопросы, как негативной трансформации фенотипа различных субпопуляций НГ при герпес-вирусных инфекциях, так и вопросы, связанные с разработкой новых подходов к экспериментальному ремоделированию

негативно трансформированного фенотипа различных субпопуляций НГ при герпес-вирусных инфекциях.

В связи с изложенным весьма актуальной проблемой является изучение особенностей негативно трансформированного фенотипа функционально значимых субпопуляций НГ, играющих важнейшую роль в реализации противовирусной защиты, а также поиск иммуотропных субстанций, регулирующих и ремодулирующих негативно трансформированный фенотип этих субпопуляций НГ при хронических герпес-вирусных инфекциях.

Целью исследования являлась разработка методов ремоделирования негативно трансформированного фенотипа функционально значимых субпопуляций нейтрофильных гранулоцитов при хронических герпес-вирусных инфекциях в эксперименте *in vitro*.

ЗАДАЧИ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Создать экспериментальные модели бактериальной и вирусной инфекции в системе *in vitro* для оценки трансформирования фенотипа субпопуляций НГ.

2. Уточнить варианты трансформации фенотипа субпопуляций $CD64^+CD32^+CD16^+CD11b^+НГ$, $CD62L^+CD63^+CD66d^+НГ$, $IFN\alpha/\beta R^+IFN\gamma^+TLR4^+НГ$ периферической крови условно-здоровых взрослых субъектов в экспериментальных моделях бактериальной и вирусной инфекции в системе *in vitro*.

3. Определить существующие варианты трансформации фенотипа субпопуляций $CD64^+CD32^+CD16^+CD11b^+НГ$, $CD62L^+CD63^+CD66d^+НГ$, $IFN\alpha/\beta R^+IFN\gamma^+TLR4^+НГ$ периферической крови взрослых субъектов при хронических герпес-вирусных инфекциях.

4. Оценить особенности влияния в системе *in vitro* гексапептида (ГП) – аргинил-альфа-аспартил-лизил-валил-тирозил-аргинин (arginyl-alpha-aspartyl-lysyl-valyl-thyrosyl-argininum) на негативно трансформированный фенотип субпопуляций $CD64^+CD32^+CD16^+CD11b^+НГ$, $CD62L^+CD63^+CD66d^+НГ$, $IFN\alpha/\beta R^+IFN\gamma^+TLR4^+НГ$ в экспериментальных моделях бактериальной и вирусной инфекции, и при хронических герпес-вирусных инфекциях.

5. Выявить особенности влияния в системе *in vitro* глюкозаминилмурамилдипептида (ГМДП) на негативно трансформированный фенотип субпопуляций $CD64^+CD32^+CD16^+CD11b^+НГ$, $CD62L^+CD63^+CD66d^+НГ$, $IFN\alpha/\beta R^+IFN\gamma^+TLR4^+НГ$ в экспериментальных моделях вирусной и бактериальной инфекции, и при хронических герпес-вирусных инфекциях.

6. Изучить в системе *in vitro* влияние рекомбинантного интерферона альфа 2b (рекИФН α 2b) на негативно трансформированный фенотип субпопуляций $CD64^+CD32^+CD16^+CD11b^+НГ$, $CD62L^+CD63^+CD66d^+НГ$, $IFN\alpha/\beta R^+IFN\gamma^+TLR4^+НГ$ в экспериментальных моделях вирусной и бактериальной инфекции, и при хронических герпес-вирусных инфекциях.

НАУЧНАЯ НОВИЗНА

Впервые показаны фенотипические характеристики субпопуляций НГ $CD64^+CD32^+CD16^+CD11b^+НГ$, $CD62L^+CD63^+CD66d^+НГ$, $IFN\alpha/\beta R^+IFN\gamma^+TLR4^+НГ$ периферической крови условно-здоровых взрослых субъектов.

Созданы модели бактериальной и вирусной инфекции в системе *in vitro* для оценки трансформирования фенотипа субпопуляций $CD64^+CD32^+CD16^+CD11b^+H\Gamma$, $CD62L^+CD63^+CD66d^+H\Gamma$, $IFN\alpha/\beta R^+IFN\gamma^+TLR4^+H\Gamma$.

Изучена трансформация фенотипа субпопуляции $IFN\alpha/\beta R^+IFN\gamma^+TLR4^+H\Gamma$ при различных хронических герпес-вирусных инфекциях.

Впервые показаны варианты трансформации фенотипа субпопуляций $CD64^+CD32^+CD16^+CD11b^+H\Gamma$, $CD62L^+CD63^+CD66d^+H\Gamma$, $IFN\alpha/\beta R^+IFN\gamma^+TLR4^+H\Gamma$ периферической крови условно-здоровых взрослых субъектов в экспериментальных моделях бактериальной и вирусной инфекции в системе *in vitro*.

Впервые показаны варианты трансформации фенотипа субпопуляции $IFN\alpha/\beta R^+IFN\gamma^+TLR4^+H\Gamma$ периферической крови условно-здоровых взрослых субъектов при хронических герпес-вирусных инфекциях в системе *in vitro*.

Установлены новые особенности влияния ГП на трансформированный фенотип субпопуляций $CD64^+CD32^+CD16^+CD11b^+H\Gamma$, $CD62L^+CD63^+CD66d^+H\Gamma$, $IFN\alpha/\beta R^+IFN\gamma^+TLR4^+H\Gamma$ в моделях бактериальной и вирусной инфекции в системе *in vitro*.

Получены новые данные о влиянии в системе *in vitro* ГП на трансформированный фенотип субпопуляции $IFN\alpha/\beta R^+IFN\gamma^+TLR4^+H\Gamma$ при хронических герпес-вирусных инфекциях в системе *in vitro*.

Впервые в системе *in vitro* изучено влияние ГМДП на трансформированный фенотип субпопуляций $CD64^+CD32^+CD16^+CD11b^+H\Gamma$, $CD62L^+CD63^+CD66d^+H\Gamma$, $IFN\alpha/\beta R^+IFN\gamma^+TLR4^+H\Gamma$ в экспериментальных моделях бактериальной и вирусной инфекции в системе *in vitro*.

Установлены новые особенности иммуномодулирующего эффекта ГМДП на трансформированный фенотип субпопуляции $IFN\alpha/\beta R^+IFN\gamma^+TLR4^+H\Gamma$ при хронических герпес-вирусных инфекциях в системе *in vitro*.

Получены новые данные о влиянии рекомбинантного ИФНа2b на трансформированный фенотип субпопуляций $CD64^+CD32^+CD16^+CD11b^+H\Gamma$, $CD62L^+CD63^+CD66d^+H\Gamma$, $IFN\alpha/\beta R^+IFN\gamma^+TLR4^+H\Gamma$ в экспериментальных моделях бактериальной и вирусной инфекции.

Впервые в системе *in vitro* изучены особенности регуляции рекомбинантного ИФНа2b на трансформированный фенотип субпопуляции $IFN\alpha/\beta R^+IFN\gamma^+TLR4^+H\Gamma$ при хронических герпес-вирусных инфекциях в системе *in vitro*.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ РАБОТЫ

Теоретическая значимость работы состоит в следующем:

В созданной в системе *in vitro* экспериментальных моделях бактериальной и вирусной инфекции продемонстрирована трансформация фенотипа субпопуляций $CD64^+CD32^+CD16^+CD11b^+H\Gamma$, $CD62L^+CD63^+CD66d^+H\Gamma$, $IFN\alpha/\beta R^+IFN\gamma^+TLR4^+H\Gamma$.

Установлена трансформация фенотипа субпопуляции $IFN\alpha/\beta R^+IFN\gamma^+TLR4^+H\Gamma$ при хронических герпес-вирусных инфекциях в системе *in vitro*, что обуславливает хронизацию вирусного инфекционно-воспалительного процесса.

Выявлены функционально значимые рецепторы в каждой из исследованных субпопуляций, установлены варианты их трансформации.

Продемонстрирована пластичность субпопуляций $CD64^+CD32^+CD16^+CD11b^+NG$, $CD62L^+CD63^+CD66d^+NG$, $IFN\alpha/\beta R^+IFN\gamma^+TLR4^+NG$ и возможность ремодулирования их трансформированного фенотипа в моделях бактериальной и вирусной инфекции под влиянием ГП, ГМДП.

Показаны особенности неоднозначных влияний рекИФНа2b на фенотип субпопуляций $CD64^+CD32^+CD16^+CD11b^+NG$, $CD62L^+CD63^+CD66d^+NG$, $IFN\alpha/\beta R^+IFN\gamma^+TLR4^+NG$ в моделях бактериальной и вирусной инфекции.

Продемонстрированы особенности иммуномодулирующих эффектов ГП, ГМДП и рекИФНа2b на фенотип субпопуляции $IFN\alpha/\beta R^+IFN\gamma^+TLR4^+NG$ при хронических герпес-вирусных инфекциях.

Практическая значимость данного исследования состоит в следующем:

Созданные модели бактериальной и вирусной инфекции в системе *in vitro* могут быть использованы для оценки вариантов трансформации фенотипа других субпопуляций НГ, изучения функциональной активности НГ, особенностей формирования NET, изучения влияния на НГ различных иммуотропных субстанций.

Полученные параметры, характеризующие фенотип функционально значимых субпопуляций $CD64^+CD32^+CD16^+CD11b^+NG$, $CD62L^+CD63^+CD66d^+NG$, $IFN\alpha/\beta R^+IFN\gamma^+TLR4^+NG$ НГ условно-здоровых добровольцев могут быть использованы для оценки вариантов трансформации фенотипа этих и других субпопуляций НГ при различных патологических состояниях.

Новые данные об иммуномодулирующих влияниях ГП, ГМДП и их возможностях ремодулировать трансформированный в модели бактериальной и вирусной инфекции фенотип субпопуляций $CD64^+CD32^+CD16^+CD11b^+NG$, $CD62L^+CD63^+CD66d^+NG$, $IFN\alpha/\beta R^+IFN\gamma^+TLR4^+NG$ важны для разработки новых терапевтических подходов к таргетному иммуномодулированию дефектно функционирующих НГ при нетипично протекающих инфекционно-воспалительных заболеваниях.

Полученные данные об возможностях ГП, ГМДП, рекИФНа2b ремодулировать трансформированный при хронических герпес-вирусных инфекциях фенотип субпопуляции $IFN\alpha/\beta R^+IFN\gamma^+TLR4^+NG$ имеют важную значимость для разработки новых терапевтических подходов к таргетному иммуномодулированию дефектно функционирующих НГ при вирусных инфекционных заболеваниях.

ОСНОВНЫЕ ПОЛОЖЕНИЯ, ВЫНОСИМЫЕ НА ЗАЩИТУ

В созданной в системе *in vitro* экспериментальной «модели бактериальной инфекции» получена различная трансформация фенотипов 3-х субпопуляций $CD64^+CD32^+CD16^+CD11b^+NG$, $CD62L^+CD63^+CD66d^+NG$, $IFN\alpha/\beta R^+IFN\gamma^+TLR4^+NG$, в то время как в экспериментальной «модели вирусной инфекции» получена трансформация фенотипа только одной субпопуляции – $IFN\alpha/\beta R^+IFN\gamma^+TLR4^+NG$.

Иммунорегуляторные пептиды ГП, ГМДП и рекИФНа2b не влияют на

нетрансформированный фенотип субпопуляций $CD64^+CD32^+CD16^+CD11b^+NG$, $CD62L^+CD63^+CD66d^+NG$. При этом ГП, ГМДП и рекИФН α 2b оказывают различные модулирующие влияния на трансформированный фенотип всех 3-х изучаемых субпопуляций НГ в «модели бактериальной инфекции» и модулируют фенотип только субпопуляции $IFN\alpha/\beta R^+IFN\gamma^+TLR4^+NG$ в «модели вирусной инфекции».

При хронических герпес-вирусных инфекциях (ХГВИ) имеет место негативная трансформация фенотипа субпопуляции $IFN\alpha/\beta R^+IFN\gamma^+TLR4^+NG$. ГП, ГМДП и рекИФН α 2b позитивно модулируют трансформированный при ХГВИ фенотип субпопуляции $IFN\alpha/\beta R^+IFN\gamma^+TLR4^+NG$.

ЛИЧНЫЙ ВКЛАД АВТОРА В ПОЛУЧЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Автор участвовала в создании *in vitro* экспериментальных моделей бактериальной и вирусной инфекции, самостоятельно проводила все экспериментальные исследования *in vitro* по изучению влияния ГП, ГМДП, рекИФН α 2b на нетрансформированный и трансформированный в моделях бактериальной и вирусной инфекции, на трансформированный при ХГВИ фенотип 3-х субпопуляций $CD64^+CD32^+CD16^+CD11b^+NG$, $CD62L^+CD63^+CD66d^+NG$, $IFN\alpha/\beta R^+IFN\gamma^+TLR4^+NG$, освоила метод проточной цитометрии и самостоятельно оценивала результаты экспериментальных данных, полученных при проведении цитометрии, самостоятельно проводила статобработку материала и описывала полученные в экспериментах результаты.

ВНЕДРЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Модель бактериальной инфекции и модель вирусной инфекции используется в работе отдела клинико-экспериментальной иммунологии и молекулярной биологии ЦНИЛ Кубанского государственного медицинского университета.

Новые данные полученные автором при проведении настоящего исследования об особенностях трансформации фенотипа 3-х субпопуляций НГ – $CD64^+CD32^+CD16^+CD11b^+NG$, $CD62L^+CD63^+CD66d^+NG$, $IFN\alpha/\beta R^+IFN\gamma^+TLR4^+NG$ при ХГВИ внедрены в учебный процесс на кафедре клинической иммунологии, аллергологии и лабораторной диагностики Кубанского государственного медицинского университета, г. Краснодар.

АПРОБАЦИЯ РАБОТЫ

Материалы диссертационного исследования доложены: на Congress EAACI-июнь 2017, на I Международной олимпиаде по аллергологии и иммунологии для студентов и молодых ученых, проводимой Всемирной организацией по иммунопатологии (WIPO), октябрь 2018г.

ПУБЛИКАЦИИ. По теме диссертации опубликовано 12 научных статей, из них 8 статей в журналах ВАК, 2 статьи в Scopus, 2 статьи в WoS, 2 тезисов в журнале Allergy и 4 тезиса в журналах ВАК. Общее количество страниц – 91, из них автору принадлежит 17,58 страниц.

ОБЪЕМ И СТРУКТУРА ДИССЕРТАЦИИ

Диссертация изложена на 164 странице компьютерного текста и состоит из введения, обзора литературы, глав экспериментальной части (материалы и методы, результаты и обсуждение), заключения, выводов, списка сокращений и списка литературы, включающего 184 источников, в том числе 31 отечественных и 153 иностранных авторов. Работа иллюстрирована 13 рисунками и 32 таблицами.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы

Характеристика использованных биологических материалов

В работе были использованы образцы периферической венозной крови условно-здоровых лиц и пациентов, страдающих различными хроническими герпес-вирусными инфекциями. Исследования проводились на 1903 образцах периферической крови от 112 добровольцев и 36 пациентов в системе *in vitro* (табл.1). У всех субъектов, участвующих в исследовании получено информированное согласие в соответствии с этическими принципами Хельсинской декларации Всемирной медицинской ассоциации (2013).

Таблица 1. Характеристика экспериментального и клинического материала

	Контингент исследуемых лиц	Количество исследуемых лиц	Количество образцов периферической крови
	Экспериментальная часть исследования	Контрольная группа	19
Модель бактериальной инфекции		26	708
Модель вирусной инфекции		16	672
Клинический материал	Контрольная группа	15	45
	Пациенты с ХГВИ	36	432
ИТОГО		112	1903

Характеристика условно-здоровых лиц

Экспериментальное исследование проводилось на 1471 образцах периферической крови, полученных от 76 условно-здоровых лиц, обоего пола, в возрасте от 23 до 60 лет. При проведении изучений модели бактериальной инфекции исследованы 708 образцов периферической крови, полученных у 26 условно-здоровых субъектов. В модели вирусной инфекции изучено 672 образца периферической крови, полученных у 16 условно-здоровых лиц. Контрольная группа при проведении исследований трансформации НГ у лиц, страдающих хроническими герпес-вирусными инфекциями, составила 45 образцов периферической крови, полученных у 15 условно-здоровых лиц обоего пола, в возрасте от 23 до 60 лет.

Характеристика пациентов, страдающих хроническими герпес-вирусными инфекциями

Иммунологическое исследование в системе *in vitro* проводилось на 432 образцах периферической крови, полученных от 36 пациентов, обоего пола, в возрасте от 23 до 60 лет, страдающих хроническими герпес-вирусными инфекциями (ХГВИ). Все пациенты на момент проведения исследования имели обострение ХГВИ. Наличие ХГВИ было подтверждено врачом, аллергологом–иммунологом, доцентом Халтуриной Е.О. на базе Клиники МЕДСИ на Белорусской, г.Москва. В результате проведения клинико-лабораторного исследования (сбор иммунологического анамнеза, клиническое исследование, комплексное лабораторное исследование, включавшее кроме традиционных методов (клинический анализ крови, биохимический анализ крови, маркеры воспаления (СРБ), проводилась детекция герпес-

вирусных инфекций. С этой целью применялись методы серо- и ПЦР диагностики. Метод ПЦР диагностики использовали для выявления генома вирусов ВПГ1, ВПГ2, ВЭБ, ЦМВ, ВЧГ6, который определяли в биоматериалах: слюна, соскоб с миндалин, кровь, моча.

Методы иммунологического исследования

С целью диагностики фенотипических особенностей субпопуляций НГ $CD64^+CD32^+CD16^+CD11b^+НГ$, $CD62L^+CD63^+CD66d^+НГ$, $IFN\alpha/\beta R1^+IFN\gamma R^+TLR4^+НГ$ у здоровых лиц, у пациентов с ХГВИ и при проведении экспериментальных исследований в системе *in vitro* проводилось исследование методом проточной цитометрии с использованием проточного цитофлуориметра FC 500 («Beckman Coulter», США). Для детекции поверхностных мембранных рецепторов НГ с целью выявления фенотипических особенностей субпопуляций НГ были использованы конъюгаты антител $CD64 - FITC$, $CD32 - PE$, $CD16 - ECD$, $CD11b - PC5$, $CD62L-ECD$, $CD63-FITC$, $CD66d-PE$, $IFN\alpha/\beta R1-FITC$, $CD119-PE$, $TLR4-APC$ («Beckman Coulter International S.A.», Франция). Оценивалось количество НГ(%) периферической крови, экспрессирующих каждый рецептор и интенсивность их экспрессии по MFI.

Экспериментальная модель бактериальной инфекции в системе in vitro

Для изучения различных вариантов изменений фенотипа различных субпопуляций $CD64^+CD32^+CD16^+CD11b^+НГ$, $CD62L^+CD63^+CD66d^+НГ$, $IFN\alpha/\beta R1^+IFN\gamma R^+TLR4^+НГ$, происходящих под влиянием бактериальных антигенов, нами в системе *in vitro* была разработана экспериментальная модель бактериальной инфекции. С этой целью в системе *in vitro* цельную кровь условно-здоровых лиц инкубировали с бактериальным пептидом N-формил-метионил-лейцил-фенилаланином (fMLP) в особых условиях.

Экспериментальная модель вирусной инфекции в системе in vitro

Для изучения различных вариантов изменений фенотипа различных субпопуляций $CD64^+CD32^+CD16^+CD11b^+НГ$, $CD62L^+CD63^+CD66d^+НГ$, $IFN\alpha/\beta R1^+IFN\gamma R^+TLR4^+НГ$, происходящих под влиянием вирусных антигенов, нами в системе *in vitro* была разработана экспериментальная модель вирусной инфекции. С этой целью в системе *in vitro* цельную кровь условно-здоровых лиц инкубировали с двухцепочечной РНК (дцРНК) в особых условиях.

В созданных моделях бактериальной и вирусной инфекции в системе *in vitro* изучали особенности влияний иммунорегуляторного гексапептида аргинил-альфа-аспартил-лизил-валил-тирозил-аргинина (ГП), глюкозаминилмурамилдипептида (ГМДП) и рекомбинантного интерферона альфа 2b (рекИФНа2b) на нетрансформированный и трансформированный фенотип субпопуляций $CD64^+CD32^+CD16^+CD11b^+НГ$; $CD62L^+CD63^+CD66d^+НГ$; $IFN\alpha/\beta R1^+IFN\gamma R^+TLR4^+НГ$.

У пациентов с хроническими герпес-вирусными инфекциями проводилось определение особенностей фенотипа субпопуляции $IFN\alpha/\beta R1^+IFN\gamma R^+TLR4^+НГ$ в сравнении с особенностями фенотипа субпопуляции $IFN\alpha/\beta R1^+IFN\gamma R^+TLR4^+НГ$ условно-здоровых лиц. В системе *in vitro* изучали особенности влияний ГП, ГМДП и рекИФНа2b на негативно трансформированный фенотип субпопуляции $IFN\alpha/\beta R1^+IFN\gamma R^+TLR4^+НГ$ пациентов.

Статистическая обработка материала

Полученные результаты исследования были обработаны при помощи методов вариационной статистики и представлены в виде медианы, нижнего, верхнего квартиля (Me[Q1;Q3]), 95% доверительного интервала (95% ДИ) (референсные значения контроля). При анализе количественных признаков оценка достоверности различий между группами проводилась с использованием непараметрического критерия Манна-Уитни (КМУ) и/или Вилкоксона. Различия, связи и зависимости считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Ввод данных в таблицах Microsoft Excel 2007. Статистическая обработка результатов проводилась с использованием пакета прикладных программ «IBM SPSS Statistic 20».

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе исследования в системе *in vitro* была создана экспериментальная модель бактериальной инфекции с использованием fMLP (рис.1).

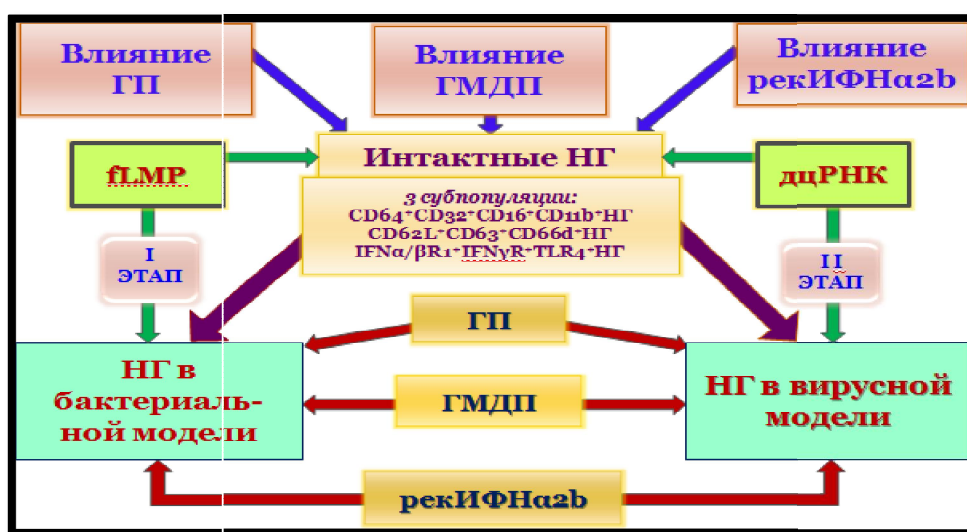


Рис. 1. Дизайн I и II этапов исследования

Показано, что бактериальный пептид fMLP способствовал трансформации фенотипа субпопуляции $CD64^+CD32^+CD16^+CD11b^+НГ$, влияя в большей степени на НГ, экспрессирующие CD64, количество которых повысилось с 1,10% до 4,1% ($p < 0,01$), при параллельном снижении количество $CD32^+НГ$ с 95,30% до 85,95% ($p < 0,01$), и уменьшении уровня экспрессии молекул CD32 по MFI с 6,18 до 4,91 ($p < 0,01$). Следует также подчеркнуть значительное повышение уровня экспрессируемых мембранных молекул CD11b по MFI с 39,30 до 68,44 ($p < 0,01$) под воздействием fMLP при не меняющемся, по сравнению с контролем, количестве $CD11b^+НГ$ ($p < 0,05$).

fMLP способствовал трансформации фенотипа субпопуляции $CD62L^+CD63^+CD66d^+НГ$: значительно снизилось количество НГ, экспрессирующих рецептор CD62L, с 93,70% до 54,80% ($p < 0,001$) с одновременным уменьшением плотности экспрессии молекул CD62L на НГ по MFI с 5,83 до 2,33 ($p < 0,001$); умеренно повысился уровень экспрессии молекулы CD63 на НГ по MFI с 3,13 до 3,58 ($p < 0,01$).

В модели бактериальной инфекции выявлена трансформация фенотипа субпопуляции $IFNα/βR^+IFNγ^+TLR4^+НГ$: повысилось количество $IFNα/βR^+НГ$ с 1,85% до 2,65% ($p < 0,01$), увеличилось число $IFNγR^+НГ$ с 3,20% до 8,40% ($p < 0,05$) и повысился процент $TLR4^+НГ$ с

19,70% до 37,45% ($p < 0,01$). При этом, практически, не проявилось влияние fMLP на плотность экспрессии этих молекул на поверхностной мембране НГ условно-здоровых лиц.

При исследовании моно-воздействия гексапептида (ГП), на нетрансформированные фенотипы субпопуляций $CD64^+CD32^+CD16^+CD11b^+НГ$, $CD62L^+CD63^+CD66d^+НГ$, $IFN\alpha/\beta R1^+IFN\gamma R^+TLR4^+НГ$ условно-здоровых субъектов, установлено отсутствие каких-либо изменений изучаемых рецепторов НГ, что является характерным для иммуотропных субстанций с иммуномодулирующим эффектом. В тоже время ГП нивелировал трансформационные изменения фенотипических характеристик субпопуляции $CD64^+CD32^+CD16^+CD11b^+НГ$, возникшие под влиянием бактериального пептида fMLP: нормализовалось число $CD64^+НГ$, увеличившееся под влиянием fMLP, с 4,10% до 1,70% ($p < 0,05$); уменьшилась повышенная плотность экспрессии по MFI молекулы CD11b на НГ с 68,44 до 56,80 ($p < 0,05$). При совместном воздействии ГП и fMLP снизилось количество $CD32^+НГ$ ($p < 0,05$).

ГП оказал ремодулирующий эффект на трансформированный фенотип субпопуляции $CD62L^+CD63^+CD66d^+НГ$: восстановил сниженное под влиянием fMLP количество $CD62L^+НГ$ с 54,80% до 73,20% ($p < 0,05$) и повысил сниженную плотность экспрессии рецептора CD62L по MFI на НГ с 2,33 до 2,93 ($p < 0,05$).

При одновременном введении ГП и fMLP по сравнению с контролем повысился процент $IFN\alpha/\beta R1^+НГ$ с 1,85% до 3,35% ($p < 0,01$). ГП нивелировал повышение количества $IFN\gamma R^+НГ$, которое наблюдалось при моно-использовании fMLP, – количество $IFN\gamma R^+НГ$ снизилось с 8,40% до 4,10% ($p < 0,05$), что, практически, не отличалось от уровня контроля ($p > 0,05$). При одновременном введении ГП и fMLP, количество $TLR4^+НГ$, изменившееся под моно- влиянием fMLP в модели бактериальной инфекции, не корректировалось. Совместное воздействие fMLP и ГП не изменило плотность экспрессии всех рецепторов трансформированного фенотипа субпопуляции $IFN\alpha/\beta R1^+IFN\gamma R^+TLR4^+НГ$.

Продемонстрировано, что при воздействии ГМДП на НГ условно-здоровых лиц, отсутствуют изменения, как количества НГ субпопуляций $CD64^+CD32^+CD16^+CD11b^+НГ$, $CD62L^+CD63^+CD66d^+НГ$, $IFN\alpha/\beta R1^+IFN\gamma R^+TLR4^+НГ$, так и уровня экспрессии всех мембранных рецепторов 3-х исследуемых субпопуляций НГ. Выявленные особенности характерны для иммуотропных субстанций, обладающих иммуномодулирующими возможностями. Одномоментное добавление в культуру ГМДП и fMLP, продемонстрировало, что ГМДП нивелировал трансформационные изменения фенотипа субпопуляции $CD64^+CD32^+CD16^+CD11b^+НГ$, возникшие под влиянием бактериального пептида fMLP. Так, уменьшилось до уровня контроля с 4,10% до 1,90% ($p < 0,05$) количество $CD64^+НГ$, которое было повышено по сравнению с контролем после воздействия fMLP. Одновременно под воздействием ГМДП снизился, увеличенный под моно-влиянием fMLP, уровень экспрессии молекулы CD11b на мембране НГ, оцениваемый по MFI, с 68,44 до 64,40 ($p < 0,05$).

ГМДП нивелировал трансформационные изменения фенотипа $CD62L^+CD63^+CD66d^+НГ$, возникшие под влиянием fMLP: восстановилось количество $CD62L^+НГ$ с 54,80% до 75,60% ($p < 0,05$) и достоверно возросла плотность экспрессии CD62L по MFI с 2,33 до 3,01 ($p < 0,05$).

ГМДП, внесенный в культуру одновременно с fMLP, увеличил количество $IFN\alpha/\beta R1^+NG$; снизил повышенное в модели бактериальной инфекции под влиянием fMLP количество $IFN\gamma R^+NG$, до уровня контроля, с 8,40% до 2,80% ($p<0,05$). Полученные данные продемонстрировали, что при одновременном воздействии fMLP и ГМДП повысилось количество $TLR4^+NG$, но не изменилась плотность экспрессии молекул TLR4 на мембране НГ.

Продемонстрированы неоднозначные влияния рекИФН α 2b на нетрансформированный фенотип субпопуляций $CD64^+CD32^+CD16^+CD11b^+NG$, $CD62L^+CD63^+CD66d^+NG$, $IFN\alpha/\beta R1^+IFN\gamma R^+TLR4^+NG$ условно-здоровых лиц и на трансформированные фенотипы НГ этих субпопуляций в модели бактериальной инфекции. Так, введение рекИФН α 2b достоверно снизило плотность экспрессии CD64 на мембране интактных НГ по MFI с 1,64 до 1,19 ($p<0,001$); уменьшило количество $CD32^+NG$ с 95,30% до 30,10% ($p<0,001$) и снизило плотность экспрессии молекул CD32 на НГ по MFI с 6,18 до 1,90 ($p<0,001$). В модели бактериальной инфекции рекИФН α 2b не влиял на количество НГ, несущих молекул CD16 и уровень плотности их экспрессии. РекИФН α 2b, внесенный в культуру одновременно с fMLP, снизил количество $CD64^+NG$, повышенное под моно-влиянием fMLP, до уровня контроля – с 4,10% до 1,80% ($p<0,05$), при этом уровень плотности экспрессии рецептора CD64 на мембране НГ снизился по сравнению с контролем с 1,64 до 1,22 ($p<0,001$). РекИФН α 2b усугублял снижение количества $CD32^+NG$, вызванное fMLP, с 85,95% до 25,80% ($p<0,001$) и уровня плотности экспрессии CD32 по MFI с 4,91 до 1,81 ($p<0,001$). Число $CD11b^+NG$ в модели бактериальной инфекции под влиянием рекИФН α 2b не изменялось, в тоже время плотность экспрессии молекул CD11b по MFI значительно повысилась по сравнению с контролем с 39,30 до 74,95 ($p<0,001$).

Показано, что рекИФН α 2b не влиял на количество НГ условно-здоровых лиц с нетрансформированным фенотипом субпопуляции $CD62L^+CD63^+CD66d^+NG$, но уменьшил плотность экспрессии по MFI на мембране НГ молекул CD63 с 3,13 до 2,06 ($p<0,001$) и CD66d с 2,30 до 1,86 ($p<0,001$). Одновременное воздействия рекИФН α 2b и fMLP снизило количество CD62L до 24,90% ($p<0,001$), но не корректировало снижение плотности экспрессии молекул CD62L, возникшее под действием fMLP. Совместное воздействие fMLP и рекИФН α 2b не влияло на количество $CD63^+NG$ и $CD66d^+NG$, но уменьшило плотность экспрессии по MFI на мембране НГ молекул CD63 до 2,23 ($p<0,001$) и CD66d до 1,86 ($p<0,001$).

Выявлено, что рекИФН α 2b не влиял на количество $IFN\alpha/\beta R1^+NG$, $TLR4^+NG$ и плотность экспрессии молекул $IFN\alpha/\beta R1$, TLR4 на мембране НГ нетрансформированного фенотипа субпопуляции $IFN\alpha/\beta R1^+IFN\gamma R^+TLR4^+NG$ условно-здоровых лиц. При этом рекИФН α 2b повысил число $IFN\gamma R^+NG$ с 3,20% до 9,15% ($p<0,05$), не меняя уровень экспрессии рецептора к $IFN\gamma R$. В модели бактериальной инфекции рекИФН α 2b повысил количество НГ субпопуляции $IFN\alpha/\beta R1^+IFN\gamma R^+TLR4^+NG$ с трансформированным под действием fMLP фенотипом: количество $IFN\alpha/\beta R1^+NG$ повысилось с 2,65% до 5,10% ($p<0,05$); $IFN\gamma R^+NG$ – с 8,40% до 25,00% ($p<0,001$); $TLR4^+NG$ – с 37,45% до 67,00% ($p<0,001$), при этом плотность экспрессии этих рецепторов не менялась.

На втором этапе исследования в системе *in vitro* была создана экспериментальная модель вирусной инфекции с использованием дцРНК (рис.1).

Создана экспериментальная модель вирусной инфекции в системе *in vitro* с использованием двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (дцРНК) (рис. 1). Показано отсутствие изменений фенотипа субпопуляций $CD64^+CD32^+CD16^+CD11b^+H\Gamma$, $CD62L^+CD63^+CD66d^+H\Gamma$ периферической крови условно-здоровых взрослых под влиянием дцРНК. Продемонстрированы различные варианты трансформации фенотипа субпопуляции $IFN\alpha/\beta R^+IFN\gamma^+TLR4^+H\Gamma$ периферической крови условно-здоровых взрослых субъектов. Так, в контрольной группе условно-здоровых субъектов ($IFN\alpha/\beta R^+IFN\gamma R^+TLR4^+H\Gamma$ без воздействия дцРНК) выявлено 2 подгруппы $IFN\alpha/\beta R1^+IFN\gamma R^+TLR4^+H\Gamma$, показатели которых достоверно различались между собой по каждому рецептору. Первая подгруппа характеризовалась низким количеством $H\Gamma$, вторая – с высоким количеством $H\Gamma$, экспрессирующих рецепторы $IFN\alpha/\beta R1$, $IFN\gamma R^+H\Gamma(CD119)$ и $TLR4$. Этот феномен, по-видимому, свидетельствует о том, что условно-здоровые лица, имеющие более высокий уровень $H\Gamma$, экспрессирующих изучаемые рецепторы, в момент проведения исследования были здоровы, но имели контакт с вирусной инфекцией, о котором не подозревали. При этом $H\Gamma$ в ответ на контакт с вирусами реализовали адекватный ответ, что не позволило манифестировать вирусной инфекции.

В созданной с применения дцРНК экспериментальной вирусной модели выявлена различная трансформация фенотипа субпопуляции $IFN\alpha/\beta R1^+IFN\gamma R^+TLR4^+H\Gamma$ с перестройкой экспрессии различных рецепторов: повысился процент $H\Gamma$, экспрессирующих на поверхностной мембране $H\Gamma$ рецептор $IFN\alpha/\beta R1$ в обеих подгруппах: в первой подгруппе количество $IFN\alpha/\beta R1^+H\Gamma$ повысилось с 1,00% до 1,70% ($p<0,05$), во второй подгруппе – повысилось с 1,90% до 3,35% ($p<0,01$), различие между подгруппами достоверно ($p<0,01$); увеличилось количество $IFN\gamma R^+H\Gamma(CD119^+H\Gamma)$ в подгруппе с более низким количеством $IFN\gamma R^+H\Gamma(CD119^+H\Gamma)$ с 2,00% до 9,80% ($p<0,05$) и число $IFN\gamma R^+H\Gamma(CD119^+H\Gamma)$ в подгруппе с более высоким процентом $CD119^+H\Gamma$ снизилось с 32,30% до 9,70% ($p<0,01$); количество $H\Gamma$, несущих молекулы $TLR4$, в подгруппе с более низким уровнем увеличилось с 5,05% до 37,40% ($p<0,05$) и в подгруппе с более высоким уровнем $TLR4^+H\Gamma$ повысилось с 30,40% до 43,60% ($p<0,05$) (табл.2).

При исследовании влияния ГП продемонстрирован классический иммуномодулирующий эффект, который проявился при его моно- и совместном воздействии с дцРНК на нетрансформированный фенотип субпопуляций $CD64^+CD32^+CD16^+CD11b^+H\Gamma$, $CD62L^+CD63^+CD66d^+H\Gamma$ условно-здоровых лиц в модели вирусной инфекции отсутствием каких-либо изменений изучаемых рецепторов $H\Gamma$.

ГП нивелировал повышение количества $IFN\alpha/\beta R^+H\Gamma$ под действием дцРНК : снизил число $IFN\alpha/\beta R^+H\Gamma$ ($p<0,05$) до уровня контроля подгруппы с более низким уровнем. ГП в подгруппе с более низким количеством $CD119^+H\Gamma$ способствовал уменьшению повышения количества $CD119^+H\Gamma$, возникшего под влиянием дцРНК, с 9,80% до 4,20% ($p<0,05$), при этом в подгруппе с более высоким уровнем $CD119^+H\Gamma$ ГП способствовал восстановлению количества $CD119^+H\Gamma$ до уровня контроля. При совместном воздействии дцРНК и ГП произошло повышение количества $TLR4^+H\Gamma$ по сравнению с контролем. Совместное воздействие дцРНК и ГП не

изменило плотность экспрессии рецепторов трансформированного фенотипа субпопуляции $IFN\alpha/\beta R1^+IFN\gamma R^+TLR4^+НГ$ (табл.2).

В модели вирусной инфекции, полученной *in vitro* после воздействия на НГ условно-здоровых лиц дцРНК, ГМДП не влиял на неизменный фенотип субпопуляций $CD64^+CD32^+CD16^+CD11b^+НГ$, $CD62L^+CD63^+CD66d^+НГ$.

В тоже время ГМДП нивелировал трансформационные изменения фенотипа $IFN\alpha/\beta R1^+IFN\gamma R^+TLR4^+НГ$, возникшие под влиянием дцРНК: восстановилось количество $IFN\alpha/\beta R1^+НГ$ в обеих подгруппах до уровня контроля ($p_1 < 0,05$; $p_2 < 0,05$); восстановилось количество $IFN\gamma R^+НГ$ в подгруппе 2, сниженное под влиянием дцРНК, с 9,70% до 26,60% ($p_2 < 0,05$); при этом совместное введение ГМДП и дцРНК в культуру клеток способствовало увеличению количества $TLR4^+НГ$ по в обеих подгруппах. В модели вирусной инфекции показано, что ГМДП не влияет на плотность экспрессии молекул $IFN\alpha/\beta R1$, $IFN\gamma R$, $TLR4$ на мембране трансформированного фенотипа субпопуляции $IFN\alpha/\beta R1^+IFN\gamma R^+TLR4^+НГ$ (табл.2).

Полученные данные свидетельствуют об отсутствии эффекта влияния реИФН α 2b на нетрансформированный фенотип субпопуляций $CD64^+CD32^+CD16^+CD11b^+НГ$, $CD62L^+CD63^+CD66d^+НГ$ в модели вирусной инфекции.

В тоже время установлено, что влияния реИФН α 2b на трансформированный *in vitro* в экспериментальной модели вирусной инфекции фенотип субпопуляции $IFN\alpha/\beta R1^+IFN\gamma R^+TLR4^+НГ$ имели свои закономерности. Так, реИФН α 2b оказал модулирующее влияние на нетрансформированные НГ: достоверно повысил количество $IFN\alpha/\beta R1^+НГ$ в группе с более высоким уровнем с 1,90% до 2,90% ($p < 0,05$); повысил число $CD119^+НГ$ в группе с более низким уровнем с 2,00% до 5,10% ($p < 0,05$); количество $TLR4^+НГ$ в обеих группах повысилось: в первой подгруппе реИФН α 2b увеличил количество $TLR4^+НГ$ с 5,05% до 16,75% ($p < 0,05$), во второй подгруппе – с 30,40% до 44,70% ($p < 0,05$). РеИФН α 2b не влиял на плотность экспрессии рецепторов $IFN\alpha/\beta R1$, $IFN\gamma R$ и $TLR4$ на поверхностной мембране НГ нетрансформированного фенотипа субпопуляции $IFN\alpha/\beta R1^+IFN\gamma R^+TLR4^+НГ$ интактных НГ условно-здоровых лиц (табл.2, рис.2).

В модели вирусной инфекции одновременное воздействие дцРНК и реИФН α 2b повысило количество $IFN\alpha/\beta R1^+НГ$ по сравнению с контролем с 1,90% до 3,60% ($p < 0,01$) в подгруппе с более высоким уровнем экспрессии рецептора $IFN\alpha/\beta R1$ на НГ. РеИФН α 2b при совместном введении с дцРНК увеличили число $IFN\gamma R^+НГ$ в подгруппе с более низким числом $IFN\gamma R^+НГ$ по сравнению с уровнем контроля с 2,00% до 7,10% ($p < 0,05$); реИФН α 2b восстановил количество $IFN\gamma R^+НГ$ в группе с более высоким уровнем $IFN\gamma R^+НГ$, снизившееся при моно-воздействии дцРНК, с 9,70% до 26,90% ($p < 0,05$). Количество $TLR4^+НГ$ в обеих группе увеличились по сравнению с контролем при одномоментном воздействии дцРНК и реИФН α 2b: в первой группе количество $TLR4^+НГ$ увеличилось с 5,05% до 35,60% ($p < 0,05$), во второй группе – повысилось с 30,40% до 49,85% ($p < 0,05$). Совместное воздействие дцРНК и реИФН α 2b не изменило плотность экспрессии каждой молекулы трансформированного в модели вирусной инфекции фенотипа субпопуляции $IFN\alpha/\beta R1^+IFN\gamma R^+TLR4^+НГ$ (табл.2).

Таблица 2. Влияние ГП, ГМДП и реиФН α 2b на трансформированный фенотип субпопуляции IFN α / β R1⁺IFN γ R⁺TLR4⁺НГ в экспериментальной модели вирусной инфекции;

	Контроль		дцРНК		дцРНК+ГП		дцРНК+ГМДП		РеиФН α 2b		дцРНК+РеиФН α 2b	
IFN α / β R1 ⁺ НГ	Группа 1: 1,00 [0,73; 1,20]	p5**	Группа 1: 1,70 [1,15; 1,85] p1 **	p6*	Группа 1: 1,00 [0,60; 1,75] p1 *** p2**	p7*	Группа 1: 0,85 [0,63; 1,30] p1 *** p3**	p8**	Группа 1: 1,00 [0,75; 1,40] p1 *** p2 ***	p9*	Группа 1: 1,50 [1,00; 2,65] p1 ** p4***	p10**
	Группа 2: 1,90 [1,50; 2,30]		Группа 2: 3,35 [2,88; 8,95] p1 *		Группа 2: 4,70 [3,38; 5,65] p1 * p2***		Группа 2: 1,90 [1,30; 2,25] p1 *** p3*		Группа 2: 2,90 [2,28; 4,65] p1 ** p2 ***		Группа 2: 3,60 [2,33; 5,10] p1 * p4***	
CD119 ⁺ НГ	Группа 1: 2,00 [1,25; 3,35]	p5*	Группа 1: 9,80 [5,05; 11,30] p1 **	p6**	Группа 1: 4,20 [3,75; 4,43] p1 ** p2**	p7**	Группа 1: 7,50 [3,03; 10,70] p1 ** p3***	p8**	Группа 1: 5,10 [3,85; 6,95] p1 ** p2 ***	p9**	Группа 1: 7,10 [5,15; 9,60] p1 ** p4***	p10**
	Группа 2: 32,30 [19,15; 46,40]		Группа 2: 9,70 [4,65; 15,73] p1 *		Группа 2: 29,60 [11,50; 37,80] p1 *** p2**		Группа 2: 26,60 [14,85; 33,88] p1 *** p3**		Группа 2: 25,50 [16,40; 37,25] p1 *** p2 **		Группа 2: 26,90 [8,83; 37,73] p1 *** p4**	
TLR4 ⁺ НГ	Группа 1: 5,05 [1,65; 7,53]	p5*	Группа 1: 37,40 [16,83; 55,88] p1 **	p6***	Группа 1: 43,10 [7,35; 48,55] p1 ** p2***	p7***	Группа 1: 26,50 [10,50; 49,25] p1 * p3***	p8***	Группа 1: 16,75 [8,20; 29,35] p1 ** p2 ***	p9**	Группа 1: 35,60 [19,95; 62,95] p1 ** p4***	p10***
	Группа 2: 30,40 [21,50; 36,85]		Группа 2: 43,60 [34,65; 48,28] p1 **		Группа 2: 40,50 [34,30; 59,15] p1 ** p2***		Группа 2: 51,05 [38,00; 61,63] p1 ** p3***		Группа 2: 44,70 [38,28; 66,28] p1 ** p2 ***		Группа 2: 49,85 [37,03; 52,85] p1 ** p4***	

* – при $p < 0,01$; ** – при $p < 0,05$; *** – при $p > 0,05$; p1 – достоверность различия по сравнению с контролем; p2 – достоверность различия между группой дцРНК+ГП и группой дцРНК; p3 – достоверность различия между группой дцРНК+ГМДП и группой дцРНК; p4 – достоверность различия между группой дцРНК+ реиФН α 2b и группой дцРНК; p5 – достоверность различий между группами контроля; p6 – достоверность различий между группами под влиянием дцРНК; p7 – достоверность различий между группами под влиянием дцРНК+ГП; p8 – достоверность различий между группами под влиянием дцРНК+ГМДП; p9 – достоверность различий между группами под влиянием реиФН α 2b; p10 – достоверность различий между группами под влиянием дцРНК+реиФН α 2b

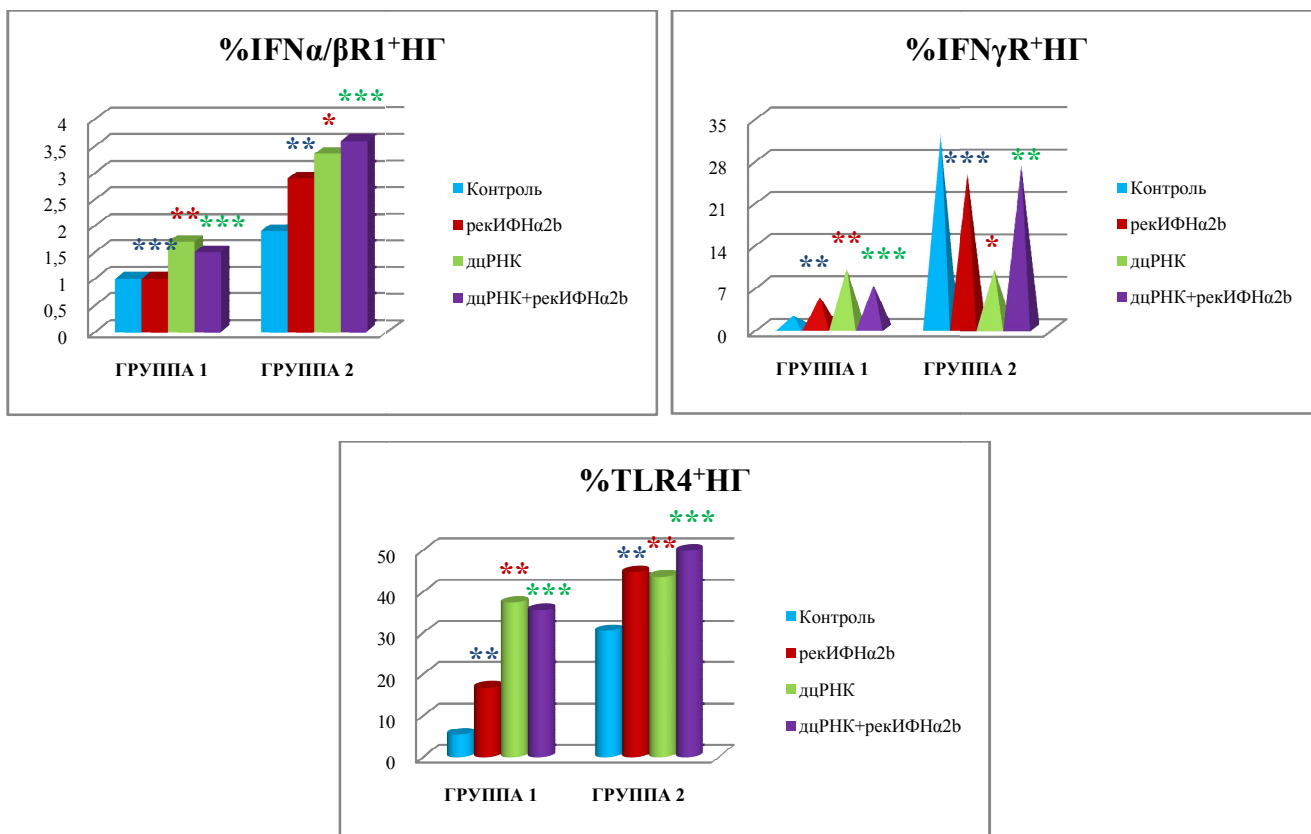


Рисунок 2. Влияние реИФН α 2b на количество НГ, экспрессирующих рецепторы к IFN α / β R1, IFN γ R и TLR4 субпопуляции IFN α / β R1⁺IFN γ R⁺TLR4⁺НГ в экспериментальной вирусной модели;

- * – при $p < 0,01$; ** – при $p < 0,05$; *** – при $p > 0,05$;
- * – при $p < 0,01$; ** – при $p < 0,05$; *** – при $p > 0,05$;
- * – при $p < 0,01$; ** – при $p < 0,05$; *** – при $p > 0,05$;
- * – достоверность различия между контролем и реИФН α 2b;
- * – достоверность различия между контролем и дцРНК;
- * – достоверность различия между дцРНК и дцРНК+реИФН α 2b;

На третьем этапе исследования в системе *in vitro* были исследованы и оценены особенности) фенотипа и количество НГ всех 3-х функционально значимых субпопуляций у условно-здоровых добровольцев (табл. 3).

Таблица 3. Основные параметры, характеризующие фенотип функционально значимых субпопуляций нейтрофильных гранулоцитов условно-здоровых добровольцев

Субпопуляции НГ (частота встречаемости в %) M \pm m	Рецепторы НГ	95%доверительный интервал частоты встречаемости каждого НГ с мембранным рецептором в %	95%доверительный интервал плотности экспрессии каждого рецептора на мембране НГ (уровень MF1)
CD64 ⁺ CD32 ⁺ CD16 ⁺ CD11b ⁺ НГ 1,50 \pm 0,42%	CD64	1,11 – 2,95	1,18 – 1,27
	CD32	33,87 – 73,89	2,01 – 3,22
	CD16	72,29 – 97,45	15,23 – 26,18
	CD11b	99,00 – 100,00	62,33 – 77,32
CD62L ⁺ CD63 ⁺ CD66d ⁺ НГ 74,90 \pm 3,00%	CD62L	77,99 – 106,22	4,79 – 6,59
	CD63	98,00 – 100,00	1,99 – 2,17
	CD66d	61,52 – 78,92	1,59 – 2,35
IFN α / β R1 ⁺ IFN γ R ⁺ TLR4 ⁺ НГ 3,80 \pm 1,37%	IFN α / β R1	2,22 – 12,23	1,01 – 1,60
	CD119	14,36 – 24,17	1,14 – 1,18
	TLR4	4,77 – 8,47	1,09 – 1,15

Оценивали, как количество интактных нетрансформированных НГ (%) периферической крови условно-здоровых лиц, экспрессирующих CD64, CD32, CD16, CD11b; CD62L, CD63, CD66d; IFN α / β R1, IFN γ R, TLR4 рецепторы, так и плотность их экспрессии по MFI. Показано, что у условно-здоровых лиц (контрольная группа) количество неизмененных НГ, несущих рецептор IFN α / β R1 (IFN α / β R1⁺НГ) составило 2,50% [1,25; 3,55] с 95% ДИ: 1,14 – 3,79%; плотность экспрессии молекул IFN α / β R1 на мембранной поверхности НГ была равна 1,10 [1,08; 1,29], при этом 95% ДИ составил 1,09 – 1,23. В контрольной группе количество НГ, экспрессирующих молекулы CD119 на мембране (CD119⁺НГ) составило 20,10% [15,48; 27,10] с 95% ДИ равным 16,33 – 24,65%; MFI CD119⁺НГ был равен 1,16 [1,13; 1,19] с 95% ДИ 1,14 – 1,18. Число НГ, несущих молекулы TLR4 условно-здоровых лиц (контрольной группы) составило 8,40% [6,50; 10,00], 95% ДИ составил 6,91 – 9,64%; при этом плотность экспрессии TLR4 по MFI была 1,14 [1,07; 1,16] с 95% ДИ: 1,14 – 1,20.

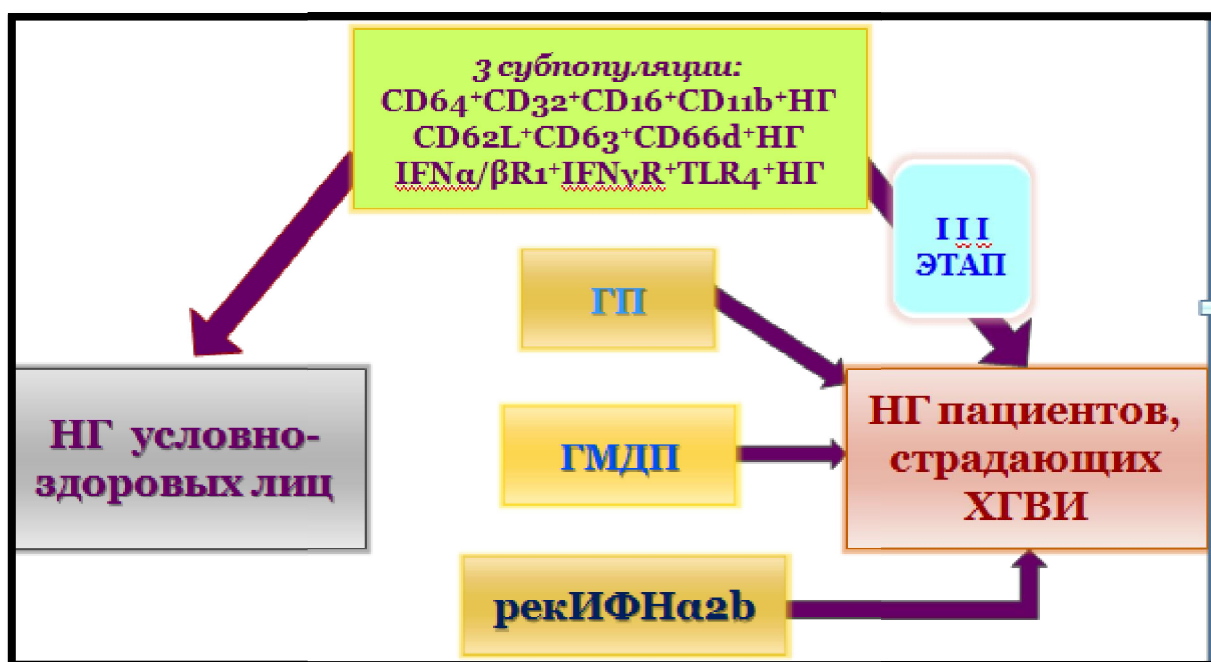


Рис. 3. Дизайн III этапа исследования

Анализ экспериментальных данных, полученных в модели вирусной инфекции продемонстрировал значительные изменения фенотипа только субпопуляции IFN α / β R1⁺IFN γ R⁺TLR4⁺НГ под влиянием дцРНК, что послужило основанием для детального изучения именно этой субпопуляции НГ периферической крови у пациентов, страдающих различными хроническими герпес-вирусными инфекциями (ХГВИ). Полученные данные продемонстрировали особенности трансформации фенотипа субпопуляции IFN α / β R1⁺IFN γ R⁺TLR4⁺НГ у пациентов с ХГВИ. В группе пациентов с ХГВИ процент IFN α / β R1⁺НГ составил 4,40% [2,20; 5,60], что было выше в 1,76 раза, чем количество IFN α / β R1⁺НГ в контрольной группе ($p < 0,01$); плотность экспрессии этого рецептора на мембранной поверхности НГ в группе пациентов с ХГВИ не отличалась от контроля ($p > 0,05$) и составила 1,08 [1,06; 1,23]. У пациентов с ХГВИ количество CD119⁺НГ составило 28,95% [24,45; 37,40], что достоверно выше, чем у лиц контрольной группы ($p < 0,05$). При этом плотность экспрессии рецептора CD119 на мембране НГ по MFI в группе пациентов с ХГВИ не

изменилась по сравнению с контрольной группой ($p > 0,05$) и составила 1,19 [1,15; 1,22]. По сравнению с контрольной группой количество TLR4⁺НГ у пациентов с ХГВИ разделилось на две группы: одна группа с более высоким уровнем TLR4⁺НГ (подгруппа 1) – количество TLR4⁺НГ составило 12,55% [9,75; 15,68], что больше чем в контрольной группе ($p < 0,05$); в другой группе количество TLR4⁺НГ было достоверно более низким (подгруппа 2), чем в контрольной группе ($p < 0,01$) и составило 6,20% [4,20; 7,00]. Различия между этими двумя подгруппами пациентов были достоверны ($p < 0,01$). Плотности экспрессии молекул TLR4 на мембране НГ в обеих подгруппах у пациентов с ХГВИ, практически, не различались между собой и достоверно не отличались от показателя контрольной группы, которые составили 1,08 [1,07; 1,19] (табл.4).

Таблица 4. Модулирующий эффект ГП, ГМДП и рекомбинантного ИФНа2b на измененный фенотип субпопуляции IFN α / β Р1⁺IFN γ Р⁺TLR4⁺НГ при ХГВИ в системе in vitro

Рецептор	Контрольная группа (Контр) Me[Q1; Q3] 95% ДИ	ХГВИ Me[Q1; Q3]	ХГВИ с ГП Me[Q1; Q3]	ХГВИ с ГМДП Me[Q1; Q3]	ХГВИ с рекИФНа2b Me[Q1; Q3]
% IFN α / β Р1 ⁺ НГ	2,50 [1,25; 3,55] 1,14 – 3,79	4,40 [2,20; 5,60] p1 **	2,10 [0,70; 4,30] p1 **** p2 **	2,35 [1,28; 4,50] p1 **** p3 ***	2,40 [1,33; 3,23] p1 **** p4 **
% IFN γ Р ⁺ НГ	20,10 [15,48; 27,10] 16,33 – 24,65	28,95 [24,45; 37,40] p1 ***	12,00 [8,45; 15,88] p1 *** p2 *	13,65 [8,20; 20,88] p1 *** p3 *	15,50 [12,55; 24,80] p1 **** p4 **
% TLR4 ⁺ НГ	8,40 [6,50; 10,00] 6,91 – 9,64	группа 1: 6,20 [4,20; 7,00] p1 *** группа 2: 12,55 [9,75; 15,68] p1 ***	группа 1: 6,60 [2,85; 9,05] p1 **** p2 **** группа 2: 3,70 [3,15; 5,55] p1 *** p2 **	группа 1: 3,40 [1,68; 5,53] p1 *** p3 *** группа 2: 3,45 [2,13; 6,48] p1 *** p3 ***	Группа 1: 4,40 [3,00; 8,10] p1 *** p4 ** Группа 2: 4,40 [3,00; 8,10] p1 *** p4 ****

* – при $p < 0,001$; ** – при $p < 0,01$; *** – при $p < 0,05$; **** – при $p > 0,05$; p1 – достоверность различия по сравнению с контролем; p2 – достоверность различия между группой ХГВИ+ГП и группой ХГВИ; p3 – достоверность различия между группой ХГВИ+ГМДП и группой ХГВИ; p4 – достоверность различия между группой ХГВИ+рекИФНа2b и группой ХГВИ; p5 – достоверность различия между группами ХГВИ рецептора TLR4; p6 – достоверность различия между группами ХГВИ+ГП рецептора TLR4; p7 – достоверность различия между группами ХГВИ+ГМДП рецептора TLR4; p8 – достоверность различия между группами ХГВИ+рекИФНа2b рецептора TLR4;

Проведено исследование влияния гексапептида аргинил-альфа-аспартил-лизил-валил-тирозил-аргинина (ГП) на измененный при ХГВИ фенотип IFN α / β Р1⁺IFN γ Р⁺TLR4⁺НГ. Анализ результатов продемонстрировал, что под влиянием ГП число НГ, несущих молекулы IFN α / β Р1 у пациентов с ХГВИ, уменьшилось с 4,40% [2,20; 5,60] до 2,10% [0,70; 4,30] ($p < 0,01$), что приблизилось к уровню контрольной группы ($p > 0,05$). Плотность экспрессии рецептора IFN α / β Р1 на поверхностной мембране НГ у пациентов с ХГВИ под влиянием ГП практически

не изменилась по сравнению с контролем ($p > 0,05$) и составила 1,16 [1,08; 1,23]. В группе пациентов с ХГВИ после инкубирования с ГП количество НГ, несущих рецепторы CD119 снизилось с 28,95% [24,45; 37,40] до 12,00% [8,45; 15,88] ($p < 0,001$); плотность экспрессии молекул CD119 на мембране НГ по MFI не отличилась от уровня контроля и составила 1,15 [1,12; 1,18]. Под влиянием ГП количество TLR4⁺НГ подгруппы 1 с более высоким уровнем у пациентов с ХГВИ снизилось с 12,55% [9,75; 15,68] до 3,70% [3,15; 5,55] ($p < 0,01$), при этом в группе с более низким количеством TLR4⁺НГ (подгруппа 2) число TLR4⁺НГ, практически, не изменилось ($p > 0,05$) и составило 6,60% [2,85; 9,05]. Плотность экспрессии молекул TLR4 на мембране НГ в группе пациентов с ХГВИ после инкубации с ГП практически не изменилась и составила 1,11 [1,07; 1,18] (табл.4, рис.4).

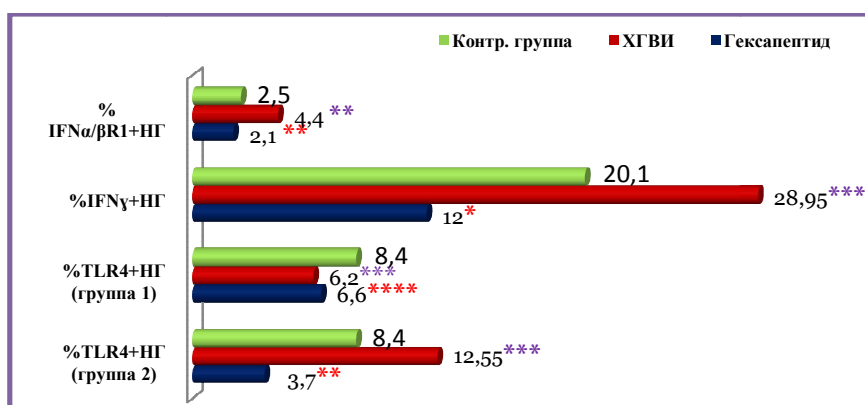


Рисунок 4. Ремодулирующий эффект ГП на трансформированный при ХГВИ фенотип субпопуляции IFNα/βR1⁺IFNγR⁺TLR4⁺ нейтрофильных гранулоцитов;

* – $p < 0,001$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,05$; **** – $p > 0,05$;

* – достоверность различия между группой ХГВИ и группой контролем;

* – достоверность различия между группой ХГВИ с ГП и группой ХГВИ;

Оценка влияний ГМДП на трансформированный фенотип субпопуляции IFNα/βR1⁺IFNγR⁺TLR4⁺НГ группы пациентов с ХГВИ продемонстрировала, что под влиянием ГМДП количество НГ из группы пациентов, несущих молекулы IFNα/βR1 уменьшилось с 4,40% [2,20; 5,60] до 2,35% [1,28; 4,50] ($p < 0,05$), что приблизилось к уровню контрольной группы. Плотность экспрессии рецепторов к IFNα/βR1 на поверхностной мембране НГ у пациентов с ХГВИ под влиянием ГМДП не изменилась и составила 1,13 [1,08; 1,20]. В группе пациентов с ХГВИ после инкубирования НГ с ГМДП количество НГ, несущих рецепторы к CD119 достоверно снизилось с 28,95% [24,45; 37,40] до 13,65% [8,45; 15,88] ($p < 0,001$); плотность экспрессии молекул CD119 на мембране НГ по MFI не отличилась от уровня контроля и составила 1,15 [1,13; 1,18].

Под влиянием ГМДП число TLR4⁺НГ подгруппы Г1 с более высоким количеством TLR4⁺НГ снизилось с 12,55% [9,75; 15,68] до 3,45% [2,13; 6,48] ($p < 0,05$), число TLR4⁺НГ в подгруппе 2 с более низким уровнем TLR4⁺НГ (Г2) у пациентов с ХГВИ снизилось с 6,20% [4,20; 7,00] до 3,40% [1,68; 5,53] ($p < 0,05$). Плотность экспрессии молекул TLR4 на мембране НГ в группе пациентов с ХГВИ после инкубации с ГМДП практически не изменилась и составила 1,10 [1,06; 1,17] в обеих группах (табл.4, рис. 5).

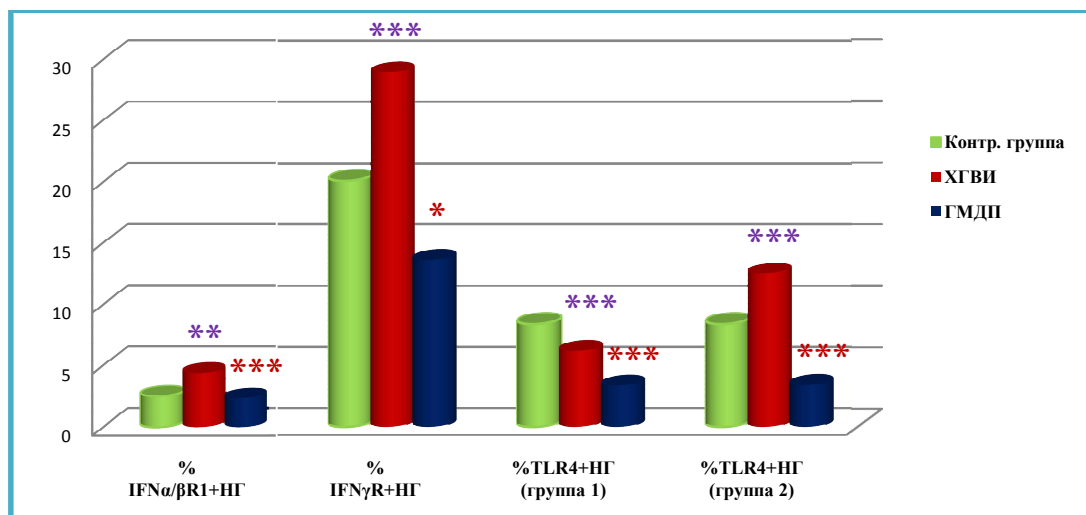


Рисунок 5. Динамика позитивного модулирования трансформированного фенотипа субпопуляции $IFN\alpha/\beta R1^+IFN\gamma R^+TLR4^+HG$ у пациентов с ХГВИ после воздействия ГМДП;
 * – $p < 0,001$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,05$;
 * – достоверность различия между группой ХГВИ и группой контролем;
 * – достоверность различия между группой ХГВИ с ГМДП и группой ХГВИ;

Изучены особенности влияний рекомбинантного ИФНа2b (рекИФНа2b) на трансформированный фенотип субпопуляции $IFN\alpha/\beta R1^+CD119^+TLR4^+HG$ пациентов с ХГВИ. Так, под влиянием рекИФНа2b количество $IFN\alpha/\beta R1^+HG$ у пациентов с ХГВИ уменьшилось с 4,65% [3,13; 5,93] до 2,40% [1,33; 3,23] ($p < 0,01$) и вошло в 1,5-б зону контроля. Количество НГ, несущих рецепторы CD119 в группе пациентов с ХГВИ после инкубирования с рекИФНа2b снизилось в 1,87 раза с 28,95% [22,15; 38,00] до 15,50% [12,55; 24,80] ($p < 0,01$), что вошло в 1,5-б зону контроля. Эти результаты можно оценить, как позитивный иммуномодулирующий эффект рекИФНа2b. Для более детальной оценки особенностей влияния рекомбинантного ИФНа2b на $TLR4^+HG$ у пациентов с ХГВИ, были сформированы 2 группы пациентов, у которых имелись значительные, достоверные различия в количестве НГ, позитивных по $TLR4^+$: в первой подгруппе пациентов с ХГВИ (ПГ1) количество $TLR4^+HG$ было повышено, по сравнению с контролем ($p < 0,05$), во второй подгруппе (ПГ2) – было понижено по сравнению с контролем ($p < 0,01$). Под влиянием рекИФНа2b выявлены разнонаправленные изменения количества $TLR4^+HG$ у пациентов с ХГВИ. Так, в группе ПГ1 рекИФНа2b значительно снизил количество $TLR4^+HG$ с 12,80% [9,70; 16,65] до 4,40% [3,00; 8,10], различия достоверны ($p < 0,01$). Количество $TLR4^+HG$ в группе ПГ2 под действием рекИФНа2b достоверно не изменилось ($p > 0,05$). Следует подчеркнуть, что после воздействия рекИФНа2b, показатели количества $TLR4^+HG$ в группах ПГ1 и ПГ2 достоверно не различались между собой ($p > 0,05$), при этом плотность экспрессии $TLR4^+HG$ по MFI после воздействия рекИФНа2b не изменилась как в группе ПГ1, так и в группе ПГ2 и составила 1,10 [1,06; 1,13] (табл.4, рис. 6).

Принимая во внимание полученные данные, можно заключить, что рекИФНа2b имеет различные эффекты влияний на рецепторы $TLR4^+$ на мембране НГ, но при этом их отличает выраженный модулирующий характер. Так, рекИФНа2b разнонаправленно влияет на высокий или низкий уровень количества НГ, экспрессирующих молекулы $TLR4$, уравнивая их

количество как в группах ПГ1, так и в группе ПГ2, но не изменяет плотность экспрессии мембранных молекул позитивных по TLR4 НГ в обеих группах (ПГ1 и ПГ2).

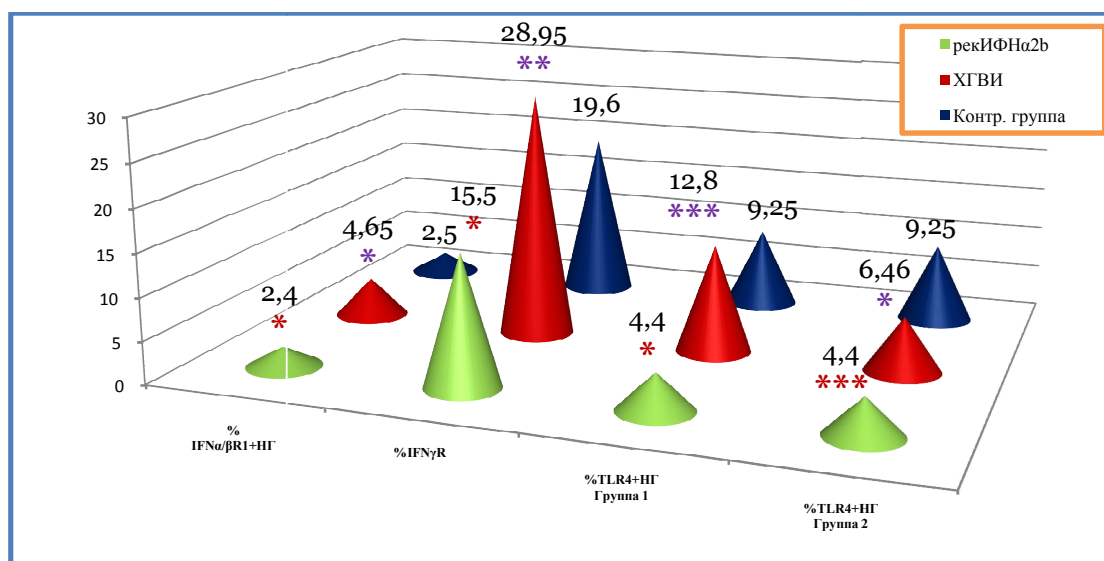


Рисунок 6. Динамика экспериментальных изменений фенотипов субпопуляции $IFN\alpha/\beta R1^+IFN\gamma R^+TLR4^+$ нейтрофильных гранулоцитов (а), плотность экспрессии (MFI) молекул $IFN\alpha/\beta R1^+$, $IFN\gamma R^+$, $TLR4^+$ на мембране нейтрофильных гранулоцитов (б);

* – $p < 0,01$; ** – $p < 0,05$; *** – $p > 0,05$;

* – достоверность различия между группой ХГВИ и группой контролем;

* – достоверность различия между группой ХГВИ с рекИФНа2b и группой ХГВИ;

Таким образом, рекИФНа2b продемонстрировал свои иммуномодулирующие свойства в системе *in vitro* – способность позитивно корректировать измененный фенотип субпопуляции $IFN\alpha/\beta R1^+IFN\gamma R^+TLR4^+НГ$ у пациентов с ХГВИ.

ВЫВОДЫ

1. Созданы 2 экспериментальные модели бактериальной инфекции с использованием fMLP и вирусной инфекции с использованием дцРНК.

2. В созданной в системе *in vitro* экспериментальной «модели бактериальной инфекции» установлены варианты трансформации фенотипа 3-х субпопуляций нейтрофильных гранулоцитов $CD64^+CD32^+CD16^+CD11b^+НГ$, $CD62L^+CD63^+CD66d^+НГ$, $IFN\alpha/\beta R^+IFN\gamma^+TLR4^+НГ$ НГ, в то время как в разработанной в системе *in vitro* экспериментальной «модели вирусной инфекции» получена трансформация фенотипа только субпопуляции $IFN\alpha/\beta R^+IFN\gamma^+TLR4^+НГ$ и продемонстрировано отсутствие фенотипического трансформирования субпопуляций $CD64^+CD32^+CD16^+CD11b^+НГ$ и $CD62L^+CD63^+CD66d^+НГ$.

3. Показано, что у пациентов с хроническими герпес-вирусными инфекциями имеются изменения уровней экспрессии рецепторов, что характеризует трансформированный фенотип субпопуляции $IFN\alpha/\beta R^+IFN\gamma^+TLR4^+НГ$.

4. ГП обладает иммуномодулирующими эффектами: не оказывает влияния на нетрансформированный и позитивно ремодулирует негативно трансформированный в «модели бактериальной инфекции» фенотип субпопуляций $CD64^+CD32^+CD16^+CD11b^+НГ$, $CD62L^+CD63^+CD66d^+НГ$, $IFN\alpha/\beta R^+IFN\gamma^+TLR4^+НГ$; в «модели вирусной инфекции» ГП не

оказывал влияния на неизменный фенотип субпопуляций $CD64^+CD32^+CD16^+CD11b^+НГ$, $CD62L^+CD63^+CD66d^+НГ$ и ремодулировал трансформированный фенотип субпопуляции $IFN\alpha/\beta R^+IFN\gamma^+TLR4^+НГ$.

5. ГМДП обладает иммуномодулирующими эффектами: не оказывает влияния на нетрансформированный и позитивно ремодулирует негативно трансформированный в «модели бактериальной инфекции» фенотип субпопуляций $CD64^+CD32^+CD16^+CD11b^+НГ$, $CD62L^+CD63^+CD66d^+НГ$, $IFN\alpha/\beta R^+IFN\gamma^+TLR4^+НГ$; в «модели вирусной инфекции» ГМДП не оказывает влияния на неизменный фенотип субпопуляций $CD64^+CD32^+CD16^+CD11b^+НГ$, $CD62L^+CD63^+CD66d^+НГ$ и ремодулировал трансформированный фенотип субпопуляции $IFN\alpha/\beta R^+IFN\gamma^+TLR4^+НГ$.

6. РекИФНа2b оказывает разнонаправленные модулирующие влияния, как на нетрансформированный, так и на негативно трансформированный в «модели бактериальной инфекции» фенотип субпопуляций $CD64^+CD32^+CD16^+CD11b^+НГ$, $CD62L^+CD63^+CD66d^+НГ$, $IFN\alpha/\beta R^+IFN\gamma^+TLR4^+НГ$, в тоже время в «модели вирусной инфекции» рекИФНа2b, не влияя на неизменный фенотип субпопуляций $CD64^+CD32^+CD16^+CD11b^+НГ$, $CD62L^+CD63^+CD66d^+НГ$, продемонстрирует разнонаправленные модулирующие эффекты влияний, как на нетрансформированный, так и на трансформированный фенотип субпопуляции $IFN\alpha/\beta R^+IFN\gamma^+TLR4^+НГ$.

7. ГП, ГМДП и рекИФНа2b в системе *in vitro* дифференцированно нивелировали изменения трансформированного при хронических герпес-вирусных инфекциях фенотипа субпопуляции $IFN\alpha/\beta R^+IFN\gamma^+TLR4^+НГ$.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Экспериментальная «Модель бактериальной инфекции» может быть использована в фармакологии, в частности, в иммунофармакологии, для оценки влияния различных фармпрепаратов и иммуотропных субстанций на функционально значимые субпопуляции НГ: $CD64^+CD32^+CD16^+CD11b^+НГ$, $CD62L^+CD63^+CD66d^+НГ$, $IFN\alpha/\beta R^+IFN\gamma^+TLR4^+НГ$.

Экспериментальная «Модель вирусной инфекции» может быть использована в фармакологии, в частности, в иммунофармакологии, для оценки влияния различных фармпрепаратов и иммуотропных субстанций на функционально значимые субпопуляции НГ: $CD64^+CD32^+CD16^+CD11b^+НГ$, $CD62L^+CD63^+CD66d^+НГ$, $IFN\alpha/\beta R^+IFN\gamma^+TLR4^+НГ$.

Разработанные подходы к исследованию трансформации фенотипа субпопуляций $CD64^+CD32^+CD16^+CD11b^+НГ$, $CD62L^+CD63^+CD66d^+НГ$, $IFN\alpha/\beta R^+IFN\gamma^+TLR4^+НГ$ при ХГВИ, могут быть использованы в лабораторной иммунодиагностике для определения необходимости проведения таргетной иммунотерапии.

Полученные данные о позитивном влиянии ГП, ГМДП и рекИФНа2b в системе *in vitro* на трансформированный фенотип функционально значимых субпопуляций $CD64^+CD32^+CD16^+CD11b^+НГ$, $CD62L^+CD63^+CD66d^+НГ$, $IFN\alpha/\beta R^+IFN\gamma^+TLR4^+НГ$ при ХГВИ, предполагают возможность использования в соответствии с инструкцией, разрешенных к

применению в клинической практике, уже существующих на основе изученных субстанций (ГП, ГМДП, рекИФН α 2b) фармпрепаратов при ХГВИ.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Nguyen, T.D.L. Remodeling of phenotype CD16+CD11b+ neutrophilic granulocytes in acute Epstein-Barr viral infection / I.V. Nesterova, G.A. Chudilova, L.V. Lomtadze, S.V. Kovaleva, N.V. Kolesnikova, M.G. Avdeeva, T.D.L. Nguyen // International Journal on Immunorehabilitation. – 2017. – Vol.19(2). – P.181-187.
2. Нгуен, Т.З.Л. Ремоделинг фенотипа CD16+CD11b+ нейтрофильных гранулоцитов при острой ВЭБ инфекции / И.В. Нестерова, Г.А. Чудилова, С.В. Ковалева, Л.В. Ломтатидзе, Н.В. Колесникова, М.Г. Авдеева, Т.З.Л. Нгуен // Аллергология и Иммунология. – 2016. – Т.17. – №4. – С.271.
3. Нгуен, Т.З.Л. Влияние гексапептида аргинил-альфа-аспартил-лизил-валил-тирозил-аргинина на экспериментально трансформированный в системе *in vitro* фенотип нейтрофильных гранулоцитов здоровых лиц / И.В. Нестерова, С.В. Хайдуков, Т.З.Л. Нгуен, А.Н. Ронжина // Российский иммунологический журнал. – 2017. – Т.11 (20). – №2. – С.176-179.
4. Нгуен, Т.З.Л. Модулирующие влияния глюкозаминилмурамилдипептида на экспериментально трансформированный фенотип нейтрофильных гранулоцитов здоровых лиц / И.В. Нестерова, С.В. Хайдуков, Т.З.Л. Нгуен, А.Н. Ронжина, С.В. Гурьянова // Российский иммунологический журнал. – 2017. – Т.11 (20). – №3. – С. 737-740.
5. Нгуен, Т.З.Л. Новый взгляд на нейтрофильные гранулоциты: переосмысление старых догм. Часть 1 / И.В. Нестерова, Н.В. Колесникова, Г.А. Чудилова, Л.В. Ломтатидзе, С.В. Ковалева, А.А. Евглевский, Т.З.Л. Нгуен // Инфекция и иммунитет. – 2017. – Т.7. – №3. – С.219–230.
6. Nguyen, T.D.L. Dysfunction of neutrophilic granulocytes in immune compromised children with viral coinfection chronic herpes-viral and recurrent respiratory infections / I.V. Nesterova, S.V. Kovaleva, G.A. Chudilova, L.V. Lomtadze, T.D.L. Nguyen // Allergy. – 2017. – Vol. 72. – Issue supplement S103. – P.25-26.
7. Нгуен, Т.З.Л. Двойственная роль нейтрофильных гранулоцитов в реализации противовирусной защиты / И.В. Нестерова, Т.З.Л. Нгуен // Аллергология и иммунология. – 2017. – Т.18. – №4. – С. 204-207.
8. Нгуен, Т.З.Л. Регуляторные пептиды модулируют трансформированный в эксперименте фенотип нейтрофильных гранулоцитов условно-здоровых лиц / Т.З.Л. Нгуен, И.В. Нестерова, С.В. Хайдуков, А.Н. Ронжина // Аллергология и иммунология. – 2017. – Т.18. – №3. – С. 180–181.
9. Нгуен, Т.З.Л. Особенности регуляторных влияний аргинил-альфа-аспартил-лизил-валил-тирозил-аргинина на интактный и экспериментально трансформированный фенотип CD62L⁺CD63⁺CD66d⁺ нейтрофильных гранулоцитов / И.В. Нестерова, Т.З.Л. Нгуен, С.В. Хайдуков, Г.А. Чудилова, Л.В. Ломтатидзе // Российский иммунологический журнал. – 2018. – Т.12(21). – №1. – С. 1–7.

10. Nguyen, T.D.L. The experimental reprogramming of phenotype of subpopulation of neutrophilic granulocytes $IFN\alpha/\beta R^+IFN\gamma R^+TLR4^+$ of healthy persons / I.V. Nesterova, L.T. Nguyen, V.V. Malinovskaya, G.A. Chudilova, L.V. Lomtadze, S.V. Kovaleva // *Allergy*. – 2018. – V. 73. – Issue supplement S 105. – P. 799–800.

11. Нгуен, Т.З.Л. Новый взгляд на нейтрофильные гранулоциты: переосмысление старых догм. Часть 2 / И.В. Нестерова, Н.В. Колесникова, Г.А. Чудилова, Л.В. Ломтатидзе, С.В. Ковалева, А.А. Евглевский, Т.З.Л. Нгуен // *Инфекция и иммунитет*. – 2018. – Т.8. – №1. – С. 7–18.

12. Нгуен, Т.З.Л. Дифференцированные влияния глюкозаминилмурамилдипептида на нетрансформированный и экспериментально трансформированный фенотип субпопуляции $CD62L^+CD63^+CD66d^+$ нейтрофильных гранулоцитов условно-здоровых лиц / И.В. Нестерова, В.В. Малиновская, С.В. Хайдуков, Т.З.Л. Нгуен, Г.А. Чудилова, Л.В. Ломтатидзе // *Медицинская иммунология*. – 2018. – Т. 20. – № 6. – С. 63-70.

13. Nguyen, T.D.L. Phenotypical transformations of $IFN\alpha/\beta R^+IFN\gamma R^+TLR4^+$ subpopulation of neutrophilic granulocytes in chronic herpes-viral infections and their experimental modulation by recombinant $IFN\alpha 2b$ / I.V. Nesterova, T.D.L. Nguyen, E.O. Khalturina, V.V. Malinovskaja // *International Journal on Immunorehabilitation*. – 2018. – Vol.10. – P.277-284.

14. Нгуен, Т.З.Л. Фенотипические изменения $IFN\alpha\beta R^+CD119^+CD284^+$ нейтрофильных гранулоцитов при хронических герпес-вирусных инфекциях и их позитивная трансформация рекомбинантным $IFN\alpha 2b$ в системе *in vitro* / И.В. Нестерова, Т.З.Л. Нгуен, Е.О. Халтурина // *Аллергология и иммунология*. – 2018. – Том 19. – №1. – С.41.

15. Nguyen, T.D.L. Phenotypic changes of $IFN\alpha\beta R^+CD119^+CD284^+$ neutrophilic granulocytes in chronic herpes-viral infections and their positive transformation by recombinant $IFN\alpha 2b$ in the “system in vitro” / I.V. Nesterova, T.D.L. Nguyen, E.O. Khalturina // *International Journal on Immunorehabilitation*. – 2018. – Vol.20. – N2. – P.93.

16. Нгуен, Т.З.Л. Регуляторные влияния рекомбинантного интерферона альфа-2b на экспериментально трансформированный фенотип $IFN\alpha/\beta R^+IFN\gamma R^+TLR4^+$ нейтрофильных гранулоцитов / И.В. Нестерова, Т.З.Л. Нгуен, В.В. Малиновская // *Аллергология и иммунология*. – 2018. – Том 19. – №1. – С.16-20.

17. Нгуен, Т.З.Л. Модулирующие эффекты глюкозаминилмурамилдипептида на трансформированный фенотип субпопуляции $IFN\alpha/\beta R^+IFN\gamma R^+TLR4^+$ нейтрофильных гранулоцитов пациентов с хроническими герпес-вирусными инфекциями в эксперименте *in vitro* / И.В. Нестерова, Т.З.Л. Нгуен, Е.О. Халтурина, С.В. Хайдуков, С.В. Гурьянова // *РИЖ*. – 2018. – Том 12 (21). – №3. – С.379-384.

18. Нгуен, Т.З.Л. Негативно трансформированный фенотип субпопуляции $IFN\alpha/\beta R^+IFN\gamma R^+TLR4^+$ нейтрофильных гранулоцитов при хронических герпес-вирусных инфекциях и его ремоделирование *in vitro* под влиянием регуляторного гексапептида / И.В. Нестерова, Т.З.Л. Нгуен, Е.О. Халтурина, С.В. Хайдуков, В.В. Малиновская // *Цитокины и воспаление*. – 2018. – Т.17. – №1-4. – С.56-61.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

НГ – нейтрофильные гранулоциты

ВОЗ – всемирная организация здравоохранения

ХГВИ – хронические герпес-вирусные инфекции

ВЭБ – вирус Эпштейна-Барр; ЦМВ – цитомегаловирус; ВЧГ6 – вирус человеческого герпеса

ВПГ1/ 2 – вирус простого герпеса типа 1/ 2; ВОЛ – вирус опоясывающего лишая

ИФН/IFNs – интерферон/ interferons

ИС – иммунная система

NETs – нейтрофильные экстрацеллюлярные сети

fLMP – N-формил-метионил-лейцил-фенилаланин

дцРНК – двухцепочечная рибонуклеиновая кислота

рекИФН α 2b – рекомбинантный интерферон альфа 2b

ГП – гексапептид (аргинил-альфа-аспартил-лизил-валил-тирозил-аргинин)

ГМДП – глюкозаминилмурамилдипептид

АННОТАЦИЯ

Во всем мире наблюдается рост хронических герпес-вирусных инфекций (ХГВИ) у иммунокомпromетированных лиц. Доказаны нарушения работы иммунной системы, в том числе нейтрофилов и системы ИФН у этих пациентов. В тоже время не изучены особенности трансформации фенотипа субпопуляций нейтрофилов при ХГВИ и не разработаны методы их иммунокоррекции.

Целью работы является разработка в эксперименте методов ремоделирования негативно трансформированного фенотипа функционально-значимых субпопуляций нейтрофильных гранулоцитов при хронических герпес-вирусных инфекциях в системе *in vitro*. Созданы 2 экспериментальные модели бактериальной инфекции с использованием fMLP и вирусной инфекции с использованием дцРНК для оценки вариантов трансформации фенотипа функционально-значимых субпопуляций НГ; установлены варианты трансформации фенотипа 3-х субпопуляций нейтрофильных гранулоцитов CD64⁺CD32⁺CD16⁺CD11b⁺НГ, CD62L⁺CD63⁺CD66d⁺НГ, IFN α / β R⁺IFN γ ⁺TLR4⁺НГ НГ в «модели бактериальной инфекции», в то время как в «модели вирусной инфекции» получена трансформация фенотипа только субпопуляции IFN α / β R⁺IFN γ ⁺TLR4⁺НГ и продемонстрировано отсутствие фенотипического трансформирования субпопуляций CD64⁺CD32⁺CD16⁺CD11b⁺НГ и CD62L⁺CD63⁺CD66d⁺НГ. Поскольку в модели вирусной инфекции получена трансформация фенотипа только 3-ей субпопуляции НГ, которая несет рецепторы к IFN α , IFN γ и TLR4, эта субпопуляция была исследована при ХГВИ. Показано, что у пациентов с ХГВИ имеются изменения уровней экспрессии рецепторов, что характеризует трансформированный фенотип субпопуляции IFN α / β R⁺IFN γ ⁺TLR4⁺НГ. Установлены особенности влияния гексапептида (аргинил-альфа-аспартил-лизил-валил-тирозил-аргинин) (ГП), глюкозаминилмурамилдипептида (ГМДП), рекомбинантного ИФН альфа 2b (рекИФН α 2b) на трансформированный фенотип субпопуляций НГ в модели бактериальной инфекции, в модели вирусной инфекции, и при ХГВИ. Продемонстрированы иммуномодулирующие эффекты этих иммуотропных субстанций на трансформированный фенотип изучаемых субпопуляций НГ при хронических герпес-вирусных инфекциях. Полученные результаты проведенного исследования могут быть использованы в фармакологии для изучения влияния иммуотропных субстанций ГП, ГМДП, рекИФН α 2b на функционально-значимые субпопуляции НГ, в лабораторной иммунодиагностике для определения необходимости проведения таргетной иммунотерапии, предполагаются возможности использования фармпрепаратов, существующих на основе исследованных субстанций, разрешенных к применению в клинической практике при ХГВИ, для коррекция негативно трансформированного фенотипа нейтрофильных гранулоцитов.

ANNOTATION

In the World, chronic herpes virus infections (chHVI) is increasing in immunocompromised individuals. It has been demonstrated in these patients that there is an immune system disorder, including neutrophils and the IFN system. The features of the phenotype transformation of neutrophil subpopulations in chHVI have not been studied, and immunocorrection methods have not been developed until now.

The aim of the study is to develop in the experimental methods for remodeling a negative transformed phenotype of functionally significant subpopulations of neutrophilic granulocytes (NG) in chronic herpes-viral infections *in vitro* system. In the study, two experimental models of bacterial infection by using fMLP and viral infection by using dsRNA were developed to evaluate the variants of the phenotype transformation of functionally significant subpopulations of NG. In the "model of bacterial infection", the variants of the phenotype transformation of 3 subpopulations of NG CD64⁺CD32⁺CD16⁺CD11b⁺NG, CD62L⁺CD63⁺CD66d⁺NG, IFN α / β R⁺IFN γ ⁺TLR4⁺NG were established. In the "model of viral infection", the transformation of the phenotype of only one subpopulation IFN α / β R⁺IFN γ ⁺TLR4⁺NG was obtained and the absence of a phenotypic transformation of subpopulations CD64⁺CD32⁺CD16⁺CD11b⁺NG and CD62L⁺CD63⁺CD66d⁺NG was demonstrated. Since in a viral infection model, the phenotype transformation of only the 3rd subpopulation of NG, which carries receptors for IFN α , IFN γ and TLR4, was obtained, only this subpopulation was studied in chHVI. It has been shown that patients with chronic herpes virus infections have changes in receptor expression levels, which characterizes the transformed phenotype of the subpopulation IFN α / β R⁺IFN γ ⁺TLR4⁺NG. The effects of hexapeptide (arginyl-alpha-aspartyl-lysyl-valyl-tyrosyl-arginine) (HP), glucosaminylmuramyl dipeptide (GMDP), recombinant IFN alpha 2b (recIFN α 2b) on the transformed phenotype of subpopulations of NG in models of bacterial infection and viral infection, and in chHVI had been established. The immunomodulatory effects of these immunotropic substances on the transformed phenotype of the studied NG subpopulations in chHVI were demonstrated. The results of the study can be used in pharmacology to study the effects of immunotropic substances: HP, GMDP, recIFN α 2b on functionally relevant subpopulations of NG, in laboratory immunodiagnostics to determine the need for targeted immunotherapy in clinical practice with chHVI, for the correction of a negative transformed phenotype of NG.