

IZDATEL'STVO
MEDITSINA



MOSCOW

115088, Moscow,
Novoostapovskaya str., 5,
building 14

Tel.: +7(495) 670-65-94

E-mail: immunol@idm.msk.ru

www.medlit.ru

ЛР № 010215 от 29.04.97

RUSSIAN ACADEMY OF MEDICAL SCIENCES
INSTITUTE OF IMMUNOLOGY OF FEDERAL MEDICAL AND BIOLOGICAL AGENCY



Z.Z. U. Lichnysov

IMMUNOLOGIYA

IMMUNOLOGY

Bimonthly scientific-practical journal

SINCE 1980

Volume 36

6

2015

NOVEMBER - DECEMBER

**Editor-in-Chief Rakhim KHAITOV,
MD, PhD, DSc, Prof., academician of RAS**

THE EDITORIAL BOARD:

LEONID ALEXEEV, corresponding member of RAS, MD, PhD, Dsc., prof. RAVSHAN ATAULLAKHANOV, MD, PhD, Dsc., prof., FIRUZ GARIB, MD, PhD, Dsc., prof., GEORGIY GUDIMA, DBS, PhD, Dsc., prof., IGOR GUSHCHIN, corresponding member of RAS, MD, PhD, Dsc., prof., NATALIA ILYNA, MD, PhD, Dsc., prof., ZAIRA KADAGIDZE, MD, PhD, Dsc., prof., EDWARD KARAMOV, DBS, PhD, Dsc., ALEXANDER KARAULOV, corresponding member of RAS, MD, PhD, Dsc., prof., NICKOLAY MEDUNITSYN, Academician of RAS, MD, PhD, Dsc., REM PETROV, Academician of RAN, BORIS PINEGIN (Deputy Editor), MD, PhD, Dsc., prof., YURI RESNIKOV, MD, PhD, Dsc., prof., IGOR SIDOROVICH, MD, PhD, Dsc., prof., ANDREY SIMBIRTSEV, MD, PhD, Dsc., prof., ALEXANDER FILATOV, DBS, PhD, Dsc., prof., IRINA FREYDLIN, corresponding member of RAS, MD, PhD, Dsc., prof., MUSA KHAITOV, MD, PhD, Dsc.

THE EDITORIAL COUNCIL:

ALEXANDER EMEL'YANOV (St. Petersburg), VLADIMIR KOZLOV (Novosibirsk), LUDMILA LUSS (Moscow), ANDREW MAYANSKY (Nizhny Novgorod), MARAT SAIDOV (Makhachkala), REVAZ SEPIASHVILI (Moscow), LUDMILA SIZYAKINA (Rostov-on-Don), NATALIA SOTNIKOVA (Ivanovo), IRINA TUZANKINA (Ekaterinburg), VALERY CHERESHNEV (Ekaterinburg)

THE INTERNATIONAL EDITORIAL COUNCIL:

TU. ARIPOVA (Tashkent, Uzbekistan), S.S GAMBAROV (Erevan, Armeniya), M.P. POTAPNEV (Minsk, Belarus)

ISSN 0206-4952

СОДЕРЖАНИЕ

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ИММУНОЛОГИЯ И ИММУНОГЕНЕТИКА

Уткин К.В., Кофиади И.А., Алексеева П.Л., Яздовский В.В., Балканов А.С., Алексеев Л.П. Иммуногенетика: новые возможности в решении задач профилактики и прогнозирования эффектов радиации малых и средних доз на индивидуальном уровне .

КЛЕТОЧНАЯ ИММУНОЛОГИЯ

Талаев В.Ю., Плеханова М.В., Воронина Е.В., Бабайкина О.Н. Созревание Т-фолликулярных хелперов *in vitro*.....

ТРАНСПЛАНТОЛОГИЯ

Шевченко О.П., Цирульникова О.М., Курабекова Р.М., Цирульникова И.Е., Олефиренко Г.А., Готье С.В. Уровень трансформирующего фактора роста $\beta 1$ в плазме крови детей-реципиентов печени и его связь с функцией трансплантата

ИНФЕКЦИОННАЯ ИММУНОЛОГИЯ

Матвеевичев А.В., Плеханова М.В., Талаев В.Ю., Цыганова М.И., Кузнецов К.В., Коршунова Е.А., Уткин О.В., Никитина З.И., Мохорова Е.В., Коптелова В.Н., Павлова Н.П. Оценка аутоиммунного гомеостаза у лиц, вакцинированных против гепатита В

Олефир Ю.В., Меркулов В.А., Воробьева М.С., Руквишников А.В., Бондарев В.П., Шевцов В.А. Отечественный препарат иммуноглобулина человека для экстренной профилактики и лечения клещевого энцефалита.....

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ И КЛИНИЧЕСКАЯ АЛЛЕРГОЛОГИЯ

Смолдовская О.В., Волошин С.А., Фейзханова Г.У., Арефьева А.С., Филиппова М.А., Масленников В. В., Резников Ю.П., Заседателев А.С., Рубина А.Ю. Применение мультиплексного флуоресцентного иммуноанализа на биочипах для скрининга в аллергодиагностике: сопоставление результатов с тест-системами MAST-CLA и ALLERG-O-LIQ

ИММУНОПАТОЛОГИЯ И КЛИНИЧЕСКАЯ ИММУНОЛОГИЯ

Нестерова И.В., Евглевский А.А., Чудилова Г.А., Ломтатидзе Л.В., Ковалева С.В., Калашников А.Е. Особенности реструктуризации хроматина и изменение уровня относительной экспрессии генов IL8, IL-1 β и TNF α нейтрофильных гранулоцитов под влиянием глюкозаминилмурамилдипептида и интерферона- γ у больных хроническим гайморитом в системе *in vitro*

Саидов М.З., Алиева М.Г., Абдуллаев А.А., Адиева С. М. Краткосрочный персонализированный прогноз клинических исходов острого коронарного синдрома по показателям эндотелиальной дисфункции

ОБЗОРЫ

Пинегин В.Б., Муругин В.В., Теплюк Н.П. Взаимосвязь между уровнем антимикробного пептида LL-37, показателями иммунитета и развитием рецидивов у больных псориазом, леченных различными методами фототерапии.....

CONTENTS

MOLECULAR IMMUNOLOGY AND IMMUNOGENETICS

Utkin K.V., Kofiyadi I.A., Alekseeva P. L., Yazdovskiy

V.V., Balkanov A.S., Alekseev L.P. Immunogenetics: new possibilities in solving problems of prevention and prediction of the effects of radiation small and medium doses at the individual level

CELL IMMUNOLOGY

Talayev V.Yu., Plehanova M.V., Voronina E.V., Babaykina O.N. Maturation of T follicular helper cells/*in vitro*

TRANSPLANTOLOGY

Shevchenko O.P., Tsiurulnikova O.M., Kurabekova R. M., Tsiurulnikova I.E., Olefirenko G.A., Gautier S. V. Blood plasma level of transforming growth factor $\beta 1$ in pediatric liver transplant recipients and its relationship with graft function

INFECTIOUS IMMUNOLOGY

Matveichev A. V., Plekhanova M.V., Talayev V.Yu., Tsi-ganova M.1., Kuznetsov K.V., Korshunova E.A., Utkin O.V., Nikitina Z.I., Mokhonova E.V., Koptelova V.N., Pavlova N.P. Autoimmune homeostasis evaluation in humans vaccinated against hepatitis B

Olefir U.V., Merkulov V.A., Vorobieva M.S., Rukavishnikov A.V., Shevtsov V.A. Russian preparation of human immunoglobulin for urgent prophylaxis and treatment of tick-borne encephalitis

EXPERIMENTAL AND CLINICAL ALLERGOLOGY

Smoldovskaya O.V., Voloshin S.A., Feyzkhanova G.U., Arefieva A.S., Filippova M.A., Maslennikov V.V., Reznikov Yu.P., Zasedatelev A.S., Rubina A.Y. Application of multiplex fluorescent immunoassay biochips for screening in allergological diagnostics: comparison of results with test systems MAST-CLA and ALLERG-O-LIQ

IMMUNOPATHOLOGY AND CLINICAL IMMUNOLOGY

Nesterova I.V., Evglevskiy A.A., Chudilova G.A., Lomtadidze L.V., Kovaleva S.V., Kalashnikov A.E. Features of restructuring chromatin and changing the level of relative expression of genes IL8, IL-1 β and TNF α of neutrophilic granulocytes influenced by glucose-aminyl-muramyl-dipeptide and interferon- γ in patients with chronic sinusitis *in vitro*

Saidov M.Z., Alieva M.G., Abdulaev A.A., Adieva S.M. The short-term personalized prognosis of clinical issues of acute coronary syndrome in endothelial dysfunction data

REVIEWS

Pinegin V.B., Murugin V.V., Teplyuk N. P. The relationship between the level of antimicrobial peptide LL-37, the indices of immunity and the development of relapses in psoriasis patients, treated by various methods of phototherapy

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2015

УДК 616.216.1-002.2-092:612.017.11-078.33

Нестерова И.В.¹, Евглевский А.А.², Чудилова Г.А.², Ломтатидзе Л.В.², Ковалева С.В.², Калашников А.Е.³

ОСОБЕННОСТИ РЕСТРУКТУРИЗАЦИИ ХРОМАТИНА И ИЗМЕНЕНИЕ УРОВНЯ ОТНОСИТЕЛЬНОЙ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ *IL8*, *IL-1β* И *TNFA* НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ ПОД ВЛИЯНИЕМ ГЛЮКОЗАМИНИЛМУРАМИЛДИПЕПТИДА И ИНТЕРФЕРОНА-Г У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ГАЙМОРИТОМ В СИСТЕМЕ *IN VITRO*

¹ГБОУ ВПО Российский университет дружбы народов Минобрнауки России, 117198, г. Москва, Россия; ²ГБОУ ВПО Кубанский государственный медицинский университет Минздрава России, 350063, г. Краснодар, Россия; ³ФГБУН Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, 119991, г. Москва, Россия

В системе *in vitro* проведено одномоментное исследование индуцированной, относительной (индуцированной/спонтанной) реструктуризации хроматина (РХ) и относительной экспрессии генов *IL8*, *IL-1β* и *TNFA* нейтрофильных гранулоцитов (НГ) периферической крови у здоровых субъектов и пациентов, страдающих хроническим гайморитом с частыми обострениями в стадии обострения («клиническая модель иммунодефицита»). При этом для оценки уровня спонтанной и индуцированной РХ был использован авторский метод с применением на финальном этапе поляризационной микроскопии при скрещенном анализаторе и поляризаторе, относительную экспрессию генов *IL8*, *IL-1β* и *TNFA* НГ определяли методом полимеразной цепной реакции. Показано, что у здоровых субъектов уровень относительной (индуцированной/спонтанной) реструктуризации хроматина выше, чем при патологии, индукция, как глюкозаминилмурамилдипептидом (ГМДП), так и интерфероном-γ (IFNγ), вызывает достоверное увеличение относительной реструктуризации хроматина НГ, сопровождающееся увеличением экспрессии генов *IL8*, *IL-1β* и *TNFA* относительно неиндуцированного контроля. В то же время у пациентов с хроническим гайморитом в фазе обострения (ХГФО) имело место нарушение уровня относительной РХ НГ, тесно связанное со снижением относительной экспрессии генов *IL8*, *IL-1β* и особенно гена *TNFA*. Предположительно, исследование относительной (индуцированной/спонтанной) РХ НГ можно использовать как интегральный метод, который позволит у пациентов, страдающих иммунодефицитом с инфекционным синдромом, обусловленным дефектами функционирования НГ, при проведении скринингового исследования, заподозрить наличие нарушений генной экспрессии НГ.

Ключевые слова: экспрессия генов; цитокины; реструктуризация хроматина; нейтрофильные гранулоциты; глюкозаминилмурамилдипептид.

Для цитирования: Иммунология. 2015; 36(6):

Nesterova I. V.¹, Evglevskiy A.A.², Chudilova G.A.², Lomtadize L. V.², Kovaleva S. V.², Kalashnikov A.E.³

FEATURES OF RESTRUCTURING CHROMATIN AND CHANGING THE LEVEL OF RELATIVE EXPRESSION OF GENES *IL8*, *IL-1β* AND *TNFA* OF NEUTROPHILIC GRANULOCYTES INFLUENCED BY GLUCOSE-AMINYLMURAMYL-DIPEPTIDE AND INTERFERON-γ IN PATIENTS WITH CHRONIC SINUSITIS *IN VITRO*

'Peoples' Friendship University of Russia, Ministry of Education and Science of Russian Federation, 117198, Moscow, Russia; ²Kuban State Medical University, Ministry of Health of Russian Federation, 350063, Krasnodar, Russia, ³N.I. Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, 119991, Moscow, Russia

The simultaneous study of induced relative (induced/spontaneous) restructuring of chromatin (RC) and the relative expression of genes *IL8*, *IL-1β* and *TNFA* of peripheral blood neutrophil granulocytes (NG) in healthy persons and in patients suffering chronic sinusitis with frequent exacerbations at acute stage («clinical model of immunodeficiency») was carried out *in vitro*. To evaluate a level of spontaneous and induced RC the author's method was applied using at final stage a polarization microscope with crossed analyzer and polarizer, and to detect *IL8*, *IL-1β* and *TNFA* genes relative expression a polymerase chain reaction was used. It was shown that in healthy persons the levels of relative (induced/spontaneous) RC were higher than in ill ones; and the induction with glucose-aminyl-muramyl-dipeptide (GMDP) as well as interferon-γ (IFNγ) caused a significant increase of relative NG RC, followed by *IL8*, *IL-1β* and *TNFA* genes expression in comparison to non-induced control. A disturbance in relative NG RC levels was shown in the patients with chronic sinusitis at acute stage and it was tightly associated with the decrease in *IL8*, *IL-1β* and especially *TNFA* genes relative expression. Presumably the study of relative (induced/spontaneous) NG RC may be used at screening examinations as an integral method which will allow to suspect the disturbances in NG genes expression in patients suffering immunodeficiency with infectious syndrome, stipulated by NG functioning defects.

Keywords: gene expression; cytokines; restructuring of chromatin; neutrophilic granulocytes; glucose-aminyl-muramyl-dipeptide.

Citation: *Immunologiya*. 2015; 36(6):

Нейтрофильные гранулоциты (НГ) - уникальные клетки иммунной системы (ИС), обладающие иммунорегуляторными свойствами, способные к экспрессии генов и синтезу

Для корреспонденции: Нестерова Ирина Вадимовна, inesteroval@yandex.ru

For correspondence: Nesterova Irina Vadimovna, inesteroval@yandex.ru

цитокинов *de novo* [1-11]. В состав хроматина — нуклеопротенда клеточного ядра НГ, составляющего основу хромосом, входят ДНК в больших количествах, гистоны, негистоновые белки и РНК. Одна из важнейших функций хроматина - защита целостности генома. Для активного хроматина характерны модификация гистонов, повышенное содержание негистоновых белков, наличие деметилированной ДНК, угловое напряжение в ДНК, наличие свободных от нуклеосом зон (участков свободной ДНК) и т. д. [7]. Структура хро-

матина претерпевает глубокие изменения в ходе экспрессии генов. Установлена взаимосвязь между изменением структуры хроматина и генной регуляцией в иммунной системе [17]. Показано, что реструктуризация хроматина (РХ) являются регуляторным механизмом, управляющим транскрипцией генов цитокинов [15]. Доказана модификация гистонов и ремоделирование хроматина при бактериальной инфекции [11]. При стимуляции НГ *E. coli* и fMLP происходили изменения уровней транскриптов 148 транскрипционных факторов, хроматин-ремоделирующих генов и 95 регуляторов белкового синтеза. Сочетанная транскрипционная регуляция, включающая изменения структуры хроматина, влияла на быстрые изменения генной экспрессии, возникающие в НГ [18]. Реализуя фагоцитарную функцию, НГ повышают экспрессию многочисленных генов, при этом они способны к параллельной активной РХ [7, 9, 12-18]. Показано, что РХ НГ носит различный, иногда разнонаправленный, характер при инфекционно-воспалительных процессах различной степени тяжести, неопластических процессах, аутоиммунной патологии и т. д. [3-5, 12].

Определенный интерес представляет уточнение связи между структурой хроматина, его способностью к реструктуризации и экспрессией генов НГ некоторых провоспалительных цитокинов, при иммунодефицитах (ИД) с инфекционным синдромом, ассоциированных с дефектами функционирования НГ. Одной из адекватных «клинических моделей ИД» с инфекционным синдромом являются пациенты, страдающие хроническим гайморитом, упорно-рецидивирующего течения с частотой рецидивов до 4–6 раз в год, нуждающиеся в антибактериальной терапии не менее 4–6 раз в год, при этом использование антибактериальной терапии не предупреждает последующих обострений хронического гайморита [19]. Следует подчеркнуть, что уточнение изменений активности хроматина НГ в сопоставлении с уровнем экспрессии генов цитокинов при хроническом гайморите ранее не проводилось.

Цель исследования: изучение особенностей индуцированной и относительной реструктуризации хроматина ядер НГ с одновременной оценкой относительной экспрессии генов *IL8*, *IL1β* и *TNFα* под индуцирующим влиянием глюкозаминилмурамилдипептида (ГМДП) и ИФНу у здоровых лиц и пациентов, страдающих хроническим гайморитом в фазе обострения (ХГФО) в системе *in vitro*.

Материалы и методы.

В группу исследования вошли 10 пациентов обоего пола в возрасте от 38 до 60 лет, страдающих хроническим гайморитом упорно-рецидивирующего течения, в фазе обострения воспалительного процесса (ХГФО), находящихся на лечении в стационаре Краснодарского краевого центра оториноларингологии (исследование проводилось до применения антибактериальной терапии и оказания хирургического пособия). Контрольную группу, сопоставимую по полу и возрасту, составили 7 условно здоровых добровольцев. Венозную кровь в объеме 4–5 мл забирали утром, натощак, в вакуэты с ЭДТА (концентрация 2,7%), затем кровь наслаивали на фиколл-верографинный градиент плотности (1,077) и выдерживали 40 мин в холодильнике (4°C). Снимали плазму с взвешенными лейкоцитами и наслаивали на градиент двойной плотности (1,093:1,077) в соотношении 1:1. Центрифугировали 15-20 мин при 1500 об/мин. На границе между двумя градиентами отбирали кольцо НГ. Клетки отмывали средой 199 дважды с последующим центрифугированием по 5 мин при 1500 об/мин для удаления надосадочной жидкости. Полученные клетки ресуспендировали и подсчитывали в камере Горяева, доводя суспензию до 1 млн. НГ/мл. Часть полученной суспензии подвергали инкубации с глюкозаминилмурамилдипептидом (ГМДП) в конечной концентрации 1 мкг/мл ГМДП (чистый продукт ГМДП синтезирован в ФГБУН ИБХ им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН и предоставлен ЗАО «Пептек», Москва) и ИФНу в конечной концентрации 1 мкг/мл (предоставлен ООО Иммунофарм, Рос-

сия). Время инкубации составило 1 час при T -37°C. После инкубации исследовали уровни экспрессии генов *IL8*, *IL1β* и *TNFα*, а также индуцированная РХ ядер НГ. Дополнительным контролем служили НГ выделенной взвеси (как больных ХГФО, так и здоровых лиц), не подвергавшиеся индукции в системе *in vitro* (неиндуцированный контроль).

Экспрессию генов *IL8*, *IL1β* и *TNFα* НГ определяли относительно неиндуцированного контроля методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени (относительная экспрессия - ОЭ). Выделение РНК из НГ осуществляли стандартным методом с использованием коммерческого набора TRI REAGENT™ (Sigma) для выделения РНК в соответствии с прилагаемой инструкцией. Для получения кДНК в качестве матрицы применяли образцы полученной РНК с проведением реакции обратной транскрипции, используя коммерческий набор RevertAid™ по инструкции производителя. ПЦР в режиме реального времени осуществляли с использованием коммерческого набора AmpliTag Gold 360 Master Mix для проведения ПЦР согласно инструкции производителя. При этом использовали коммерческие зонды для исследования экспрессии генов цитокинов *IL8*, *IL1β*, *TNFα* и *ACTB* (β-актин — референтный ген): TagMan Gene Expression Assay, s00174103_m 1; TagMan Gene Expression Assay, Hs01555410_m1; TaqMan® Gene Expression Assay, HsO 1113 624_g 1; TagMan Gene Expression Assay, HsO 1060665_g1. Общий объем амплификационной смеси составлял 20 мкл. Все реактивы фирмы Applied Biosystems (USA). Последовательность праймеров для определения экспрессии генов цитокинов представлена в табл. 1.

Подготовленный материал переносили в прибор для проведения ПЦР в режиме реального времени (Rotor-Gene 6000 series), где проводилась амплификация в автоматическом режиме по заданной программе. Расчет относительной экспрессии генов *IL8*, *IL1β* и *TNFα* осуществляли по общепринятой методике [20].

Оценка РХ ядер НГ по уровню оптической анизотропии (ОА) хроматина ядер НГ проводилась с использованием модифицированного метода Нестеровой и соавт. [3]. При этом учитывали, что при окраске ядер клеток толуидиновым синим при pH-5.0, обработанных после солянокислого гидролиза солянокислым гидроксилламиноном, возникает эффект двучепломления тем более сильный, чем более упорядоченной является структура ДНК в изучаемых ядрах. Механизм реакции состоит в том, что толуидиновый синий взаимодействует как с фосфатными группами ДНК, так и с открывшимися после гидролиза альдегидными группами, пространственная ориентация которых различна и меняется в процессе функционирования хроматина. Известно, что чем более упорядоченной по своей структуре является ДНК, тем более конденсированным является соответствующий ей хроматин, тем менее он активен в процессах экспрессии генов и тем выше уровень возникающей при окраске толуидиновым синим оптической анизотропии. Таким образом, количественный учет степени оптической анизотропии ядер позволяет судить об уровне РХ и, следовательно, об его активности. Мазки клеток крови, подсушивали на воздухе, фиксировали смесью этанол/ацетон в соотношении 1:1, подвергали гидролизу в 5 N HCl при 20 С и обработке солянокислым гидроксилламиноном, при температуре 37°C в течение 3 часов. Обработанные таким образом мазки, окраши-

Таблица 1

Последовательность праймеров генов цитокинов *IL8*, *IL1β*, *ACTB* (β-актин)

Ген	Последовательность праймера
<i>IL8</i>	GTGTGAAGGTGCAGTTTTGCCAAGG
<i>IL-1β</i>	CAGATGAAGTGCTCCTTCCAGGACC
<i>TNF</i>	TTCCTGCATCCTGTCTGGAA
<i>ACTB</i> (β-актин)	CGACAGGATGCATGCAGAAGGAGA

вали 0,05% раствором толуидинового синего при pH-5,0, приготовленного на 0,001 М цитратном буфере. Время окраски составляло 20 мин. Окрашенные препараты быстро отмывали цитратным буфером, высушивали на воздухе и исследовали под поляризационным микроскопом «МП-8» при скрещенном анализаторе и поляризаторе. Для учета интенсивности анизотропного эффекта в ядрах НГ использовали модификацию полуколичественного метода Астальди и Верга, адаптированного для изучения ядер. Все ядра были разделены по уровню оптической анизотропии на 5 групп, каждой из которых была присвоена определенная величина (степень «0» означала полное отсутствие анизотропии, что соответствовало наибольшей степени активации хроматина ядра; степень «4» означала то, что анизотропно все ядро, что соответствовало отсутствию активности хроматина; степени анизотропии от «1» до «3» соответствовали промежуточным значениям анизотропии ядра) [2, 3]. Таким образом, уровень ОА является величиной обратной по отношению к ($P = 1/OA$). Одновременно рассчитывали индекс относительной реструктуризации хроматина (ИРХ), равный отношению уровня реструктуризации после индукции (и) к его спонтанному значению (сп) значению ($ИРХ = P / P_{sp}$), что позволяет адекватно оценивать дополнительный уровень РХ а НГ, возникающий в результате индукции. Полученные данные исследования были подвергнуты статистической обработке с использованием методов вариационной статистики. Методом корреляционного анализа с использованием компьютерной программы Biostat 4.0 проанализирована корреляционная связь (КС) между уровнями индуцированной и относительной РХ и уровнем относительной экспрессии генов *IL8*, *IL1β* и *TNFα*.

Результаты исследования

У клинически здоровых лиц контрольной группы морфологически зрелые НГ периферической крови, не подвер-

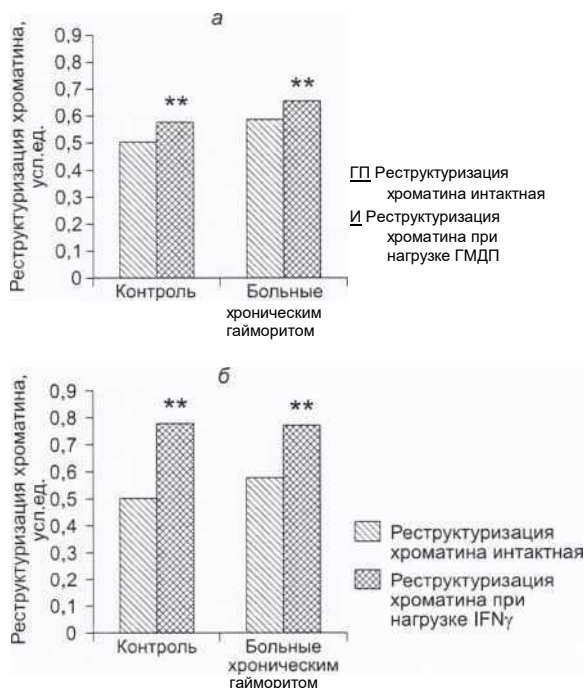


Рис. 1. Абсолютный уровень индуцированной реструктуризации хроматина (Р) НГ лиц контрольной группы и больных хроническим гайморитом в условиях индукции (индукторы: а — ГМДП; б — IFN γ).

Примечание. ** — $p < 0,01$ - достоверность отличия от контроля.

гавшиеся индуцирующему влиянию, обнаруживают уровень спонтанной РХ $0,43 \pm 0,02$ усл.ед. при коэффициенте вариации (CV) равном 12,7%, аналогичный показатель для выделенной взвеси НГ был на 16% выше и составил $0,50 \pm 0,03$ при CV = 12%. однако, это различие не было статистически значимо ($p > 0,05$). Использование в качестве индуктора ГМДП привело к увеличению уровня индуцированной РХ НГ взвеси на 14% и составило в среднем $0,57 \pm 0,02$ при CV = 9% ($p < 0,01$), а показатель относительной РХ (индуцированной/спонтанной) ИРХ был равен 1,14. При этом экспрессия гена *IL8* относительно неиндуцированного контроля составила $1,16 \pm 0,03$ (рис. 3). Уровень КС между уровнем экспрессии гена *IL8* и уровнем индуцированной РХ НГ был умеренно прямым ($R = +0,54$), при этом уровень КС между уровнем экспрессии гена *IL8* и величиной относительной РХ НГ - ИРХ был также умеренно прямым ($R = +0,59$) (см. рис. 1—3). Экспрессия гена *IL1β* относительно неиндуцированного контроля равнялась $3,24 \pm 0,5$, при этом также наблюдалась умеренная прямая корреляционная связь с уровнем индуцированной РХ НГ ($R = +0,38$), при умеренно прямом уровне КС между уровнем экспрессии гена *IL1β* и величиной относительной РХ НГ - ИРХ ($R = +0,47$). Экспрессия гена *TNFα* относительно неиндуцированного контроля составила $1,44 \pm 0,09$ (см. рис. 3). Отмечена сильная прямая КС между уровнем экспрессии гена *TNFα* и уровнем индуцированной РХ НГ ($Y = +0,76$) при умеренно прямой КС между уровнем экспрессии гена *TNFα* и величиной относительной РХ НГ — ИРХ ($R = +0,36$) (см. рис. 1—3). Полученные данные свидетельствуют, о том, что у клинически здоровых лиц при индукции НГ с применением ГМДП происходит достоверное увеличение индуцированной и относительной РХ НГ, которое сопровождается повышением экспрессии генов *IL8*, *IL1β* и *TNFα* относительно неиндуцированного контроля.

У здоровых субъектов при использовании в качестве индуктора IFN β уровень индуцированной РХ НГ взвеси составил в среднем $0,77 \pm 0,05$ усл. ед. при CV = 13% ($p < 0,001$), а ИРХ был равен 1,54. При этом экспрессия гена *IL8* относительно неиндуцированного контроля составила $1,62 \pm 0,43$ (см. рис. 1-3). Корреляционная связь между уровнем экспрессии гена *IL8* и уровнем индуцированной РХ НГ была сильной прямой ($R = +0,89$), при умеренно прямой КС между относительным уровнем экспрессии гена *IL8* и величиной относительной РХ НГ - ИРХ ($Y = +0,36$). Экспрессия гена *IL1β* относительно неиндуцированного контроля равнялась $3,8 \pm 1,01$. при этом также наблюдалась сильная прямая КС с уровнем индуцированной РХ НГ ($R = +0,94$) и умеренно прямая КС с величиной относительной РХ НГ - ИРХ ($R = +0,46$). Экспрессия гена *TNFα* относительно неиндуцированного контроля составила $1,02 \pm 0,17$. Корреляционная связь между уровнем относительной экспрессии гена *TNFα* и уровнем индуцированной РХ НГ была сильной прямой ($Y = +0,94$) при умеренно прямой КС между уровнем экспрессии

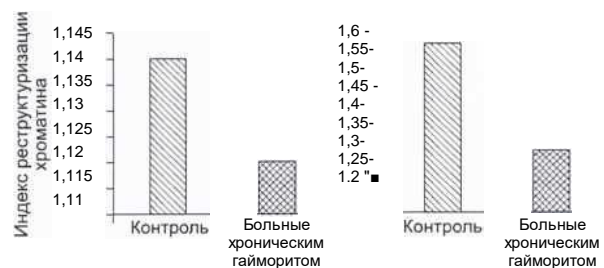


Рис. 2. Относительная реструктуризация хроматина (ИРХ = Р_и (индуцированная реструктуризация)/Р_{сп} (спонтанная реструктуризация)) НГ лиц контрольной группы и пациентов с хроническим гайморитом в условиях индукции (индукторы: а - ГМДП; б - IFN γ).

Примечание. ** — $p < 0,01$ — достоверность отличия от контроля.

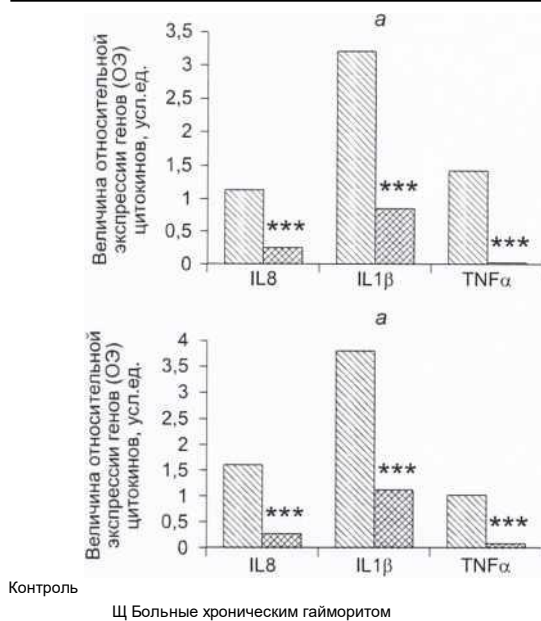


Рис. 3. Индукция относительной экспрессии генов цитокинов НГ относительно неиндуцированного контроля (индукторы: а - ГМДП; б - IFN γ).

Примечание. ***— $p < 0,001$ — достоверность отличия от контроля.

гена *TNF α* и величиной относительной РХ НГ - ИРХ ($A = +0,36$) (см. рис. 1, 3).

Полученные данные свидетельствуют о том, что у клинически здоровых лиц при индукции НГ с помощью *IFN β* , также как и при индукции НГ с помощью ГМДП, происходит достоверное увеличение индуцированной РХ НГ, которое сопровождается повышением экспрессии генов *IL8*, *IL1 β* и *TNF α* относительно неиндуцированного контроля, что подтверждается наличием сильной прямой КС между этими показателями и *TNF α* и положительной прямой КС с величиной относительной РХ НГ - ИРХ.

У пациентов, страдающих ХГФО, морфологически зрелые НГ периферической крови, не подвергавшиеся индуцирующему влиянию, обнаруживают уровень спонтанной РХ $0,53 \pm 0,01$ усл. ед. при коэффициенте вариации, равном 5%, аналогичный показатель для выделенной взвеси НГ был на 9% выше и составил $0,58 \pm 0,02$ при $CV = 6\%$, и это различие было статистически значимо ($p < 0,05$). Использование в качестве индуктора ГМДП привело к увеличению уровня индуцированной РХ НГ взвеси на 12% и составило в среднем $0,65 \pm 0,03$ при $CV = 10\%$ ($p < 0,01$), а величина относительной РХ НГ - ИРХ была равна 1,12. При этом экспрессия гена *IL8* относительно неиндуцированного контроля составила $0,25 \pm 0,05$ (см. рис. 1-3). Уровень КС между уровнем экспрессии гена *IL8* и уровнем индуцированной РХ НГ был умеренно прямым ($A = +0,53$), при умеренно прямой КС между уровнем экспрессии гена *IL8* и величиной относительной РХ НГ - ИРХ ($A = +0,32$). Экспрессия гена *IL1 β* относительно неиндуцированного контроля составила $0,84 \pm 0,19$ с практически полным отсутствием КС с уровнем индуцированной РХ НГ. В тоже время уровень КС между уровнем экспрессии гена *IL1 β* и величиной относительной РХ НГ - ИРХ оказался умеренно прямым ($A = +0,38$). Экспрессия гена *TNF α* относительно неиндуцированного контроля составила всего $0,03 \pm 0,005$ (см. рис. 3). Уровень КС между уровнем относительной экспрессии гена *TNF α* и уровнем индуцированной РХ НГ был слабым прямым ($A = +0,17$), а КС между уровнем экспрессии гена *TNF α* и величиной относительной РХ НГ - ИРХ была умеренно прямой ($A = +0,38$) (см. рис. 1, 3). Полученные данные свидетельствуют

о том, что у пациентов с ХГФО при индукции ГМДП происходит достоверное увеличение индуцированной РХ НГ, но менее выраженное, чем у здоровых лиц ($p < 0,001$), которое сопровождается повышением экспрессии гена *IL8* относительно неиндуцированного контроля, однако это повышение достоверно менее выражено, чем у здоровых лиц ($p < 0,001$). Экспрессия гена *IL1 β* также увеличивается, но при этом достоверно менее выражено, чем у здоровых лиц ($p < 0,001$). Относительная экспрессия гена *TNF α* весьма незначительна и носит «следовый» характер и достоверно меньше здорового контроля при наличии слабой положительной КС ($p < 0,001$). Следует подчеркнуть, что у пациентов, страдающих ХГФО, увеличение уровней экспрессии генов *IL8*, *IL1 β* и *TNF α* относительно неиндуцированного контроля существенно ниже, чем у здоровых лиц: на 78,4%, 74% и 98%, соответственно. В то же время отмечается умеренно прямая КС между уровнем экспрессии всех исследованных генов цитокинов и величиной относительной РХ НГ - ИРХ.

При использовании в качестве индуктора *IFN β* , уровень индуцированной РХ взвеси НГ пациентов с ХГФО, увеличился на 32,8% и составил в среднем $0,77 \pm 0,05$ при $CV = 13\%$ ($p < 0,001$), а величина относительной РХ НГ - ИРХ была равна 1,33. При этом экспрессия гена *IL8* относительно неиндуцированного контроля составила $0,22 \pm 0,07$ (см. рис. 1—3), при полном отсутствии КС с уровнем индуцированной РХ НГ. В то же время уровень КС между уровнем экспрессии гена *IL8* и величиной относительной РХ НГ - ИРХ оказался умеренно прямым ($A = +0,31$). Экспрессия гена *IL1 β* относительно неиндуцированного контроля была $1,1 \pm 0,41$. Корреляционная связь с уровнем индуцированной РХ также практически отсутствовала ($A = +0,03$), а уровень КС между уровнем экспрессии *IL1 β* и величиной относительной РХ НГ - ИРХ был умеренно прямым ($A = +0,47$). Экспрессия гена *TNF α* относительно неиндуцированного контроля составила $0,04 \pm 0,01$ при сильной прямой КС с уровнем индуцированной РХ НГ ($A = +0,85$) и умеренной прямой КС между уровнем экспрессии гена *TNF α* и величиной относительной РХ НГ - ИРХ ($R = +0,53$) (см. рис. 1-3).

Полученные данные свидетельствуют о том, что у больных, страдающих ХГФО, при индукции *IFN β* происходит достоверное, но менее выраженное, чем в контрольной группе, увеличение индуцированной и относительной РХ НГ, которое сопровождается гораздо менее выраженным повышением экспрессии генов по сравнению с контролем: для гена *IL8* ниже на 86,4%, гена *IL1 β* — на 71,1%. В то время как для гена *TNF α* повышение экспрессии имеет «следовый» характер и ниже контроля на 96,1%. При этом КС между уровнем экспрессии генов *IL8*, *IL1 β* , *TNF α* и уровнем индуцированной РХ НГ практически отсутствует. В то время как КС между уровнем экспрессии генов *IL8*, *IL1 β* , *TNF α* и относительной РХ НГ - ИРХ - всегда умеренно прямая.

Таким образом, у здоровых людей при индукции НГ в системе *in vitro* с помощью ГМДП и *IFN β* происходит достоверное увеличение индуцированной и относительной РХ НГ, сопровождающееся увеличением экспрессии генов *IL8*, *IL1 β* и *TNF α* относительно неиндуцированного контроля. Корреляционная связь между уровнем относительной экспрессии генов изученных цитокинов с уровнем относительной РХ НГ у здоровых людей всегда носит прямой характер, а ее уровень колеблется от умеренного до сильного. У пациентов, страдающих ХГФО, при индукции ГМДП и *IFN β* , НГ в системе *in vitro* происходит увеличение индуцированной и относительной РХ НГ, но оно существенно ниже, чем у здоровых субъектов и ассоциировано со снижением экспрессии генов *IL8*, *IL1 β* и *TNF α* относительно неиндуцированного контроля. Наблюдаемое снижение относительной экспрессии генов цитокинов *IL8*, *IL1 β* и *TNF α* относительно неиндуцированного контроля у пациентов с ХГФО, по-видимому, связано с тем, что, с одной стороны, первоначально индукция экспрессии этих генов НГ произошла *in vivo* при обострении хронического воспалительного процесса, а в системе *in vitro* индукция носила

уже вторичный характер и происходила на фоне истощения генной экспрессии. С другой стороны, имеет место отсутствие адекватного ответа со стороны НГ на обострение хронического бактериального процесса, из-за чего невозможно исключить наличие генетических дефектов НГ, связанных с нарушением полноценной экспрессии генов *IL8*, *IL1β* и *TNFα*, у пациентов с клиническими признаками ИД с инфекционным синдромом. Однако, этот вопрос требует дальнейшего более глубокого изучения. Известно, что НГ — быстро реагирующая на острую бактериальную инфекцию популяция иммунокомпетентных клеток, которая при развитии адекватного ответа отвечает мгновенной экспрессией генов провоспалительных цитокинов, что способствует быстрой элиминации патогена и разрешению воспаления. Наблюдаемое в данном исследовании нарушение экспрессии генов исследованных цитокинов у пациентов с ХГФО, по-видимому, и обуславливает наличие хронического упорно-рецидивирующего воспалительного бактериального процесса.

В целом, результаты проведенного исследования свидетельствуют о том, что уровень относительной РХ НГ, тесно ассоциирован с относительной экспрессией генов провоспалительных цитокинов *IL8*, *IL1β* и *TNFα*, и может являться интегральным показателем уровня генной экспрессии. Предположительно, исследование относительной (индуцированной/спонтанной) РХ НГ можно использовать как скрининговый метод, который позволит у пациентов, страдающих ИД с инфекционным синдромом, обусловленным дефектами функционирования НГ, на начальных этапах исследования заподозрить наличие нарушений генной экспрессии НГ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Мальцева В.Н., Сафронова В.Г. Неоднозначность роли нейтрофила в генезе опухоли. *Цитология*. 2009; 51(6): 467-74.
2. Нестерова И.В., Колесникова Н.В., Чудилова Г.А. Комплексное трехуровневое исследование системы нейтрофильных гранулоцитов с возможной диагностикой ИДС при различной патологии. *Методические рекомендации*. Краснодар; 1996.
3. Нестерова И.В., Евлевский А.А., Фомичева Е.В. Особенности активационного потенциала ядер нейтрофильных гранулоцитов в норме и патологии. *Цитокины и воспаление*. 2004; 3(2): 52-5.
4. Нестерова И.В., Ковалева С.В., Чудилова Г.А., Ломтатидзе Л.В., Евлевский А.А., Колесникова Н.В. др. Особенности ремоделирования фенотипа и функциональных возможностей нейтрофильных гранулоцитов пациентов с колоректальным раком под влиянием G-CSF в системе in vitro. *Иммунология*. 2012; 6: 306-11.
5. Нестерова И.В., Евлевский А. А., Фомичева Е.В., Колесникова Н.В., Ковалева С.В., Чудилова Г.А. и др. Особенности спонтанной и индуцированной реструктуризации хроматина и функционирования кислородзависимых цитотоксических механизмов нейтрофильных гранулоцитов при колоректальном раке. *Российский иммунологический журнал*. 2011; 5(3/4): 254—61.
6. Ashby J., Xuetong Shen. Chromatin remodelling beyond transcription: the INO80 and SWR1 complexes. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 2009; 10: 373-84.
7. Brinkmann V., Brinkmann V., Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps: Is immunity the second function of chromatin? *J. Cell Biol.* 2012; 198(5): 773-8.
8. Bird L., Bird L. Tumor immunology: Neutrophil plasticity. *Nature Rev. Immunol.* 2009; 9: 672-3.
9. Eid N.S., Kravill K.E., Lanks K.W. Heat-shock protein synthesis by human polymorphonuclear cells. *J. Exp. Med.* 1987; 165(5): 1448-52.
10. Fridlender Z. G., Fridlender Z. G., Jing S., Samuel K. et al. Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF- β : "N1" versus "N2" TAN. *Cancer Cell*. 2009; 16: 183-94.
11. Hamon V.F., Cossart P. Histone modifications and chromatin remodeling during bacterial infections. *Cell Host Microbe*. 2008; 4(2): 100-9.
12. Нестерова И.В., Ковалева С.В., Чудилова Г.А., Ломтатидзе Л.В., Евлевский А.А. Двойственная роль нейтрофильных гранулоцитов в реализации противоопухолевой защиты. *Иммунология*. 2012; 5: 281-7.
13. Jack R.M., Fearon D.T. Selective synthesis of m RNA and proteins by human peripheral blood neutrophils. *J. Immunol.* 1988; 140(12): 4286-93.
14. Kobayashi S.D., Voyich J.M., Buhl C.L. et al. Global changes in gene expression by human polymorphonuclear leukocytes, during receptor-mediated phagocytosis: cell fate is regulated at the level of gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2002; 99(10): 6901-6.
15. Li B., Carey M., Workman O.L. The role of chromatin during transcription. *Cell*. 2007; 128(4): 707-19.
16. Mantovani A. The yin-yang of tumor-associated neutrophils. *Cancer Cell*. 2009; 8: 173-4.
17. Smale S.T., Fisher A.G. Chromatin structure and gene regulation in the immune system. *Annu. Rev. Immunol.* 2002; 20: 427-62.
18. Zhang X., Kluger Y., Nakayama Y. et al. Gene expression in mature neutrophils: early responses to inflammatory stimuli. *J. Leukoc. Biol.* 2004; 75(2): 358.
19. Гофман В.Р., Смирнов В.С. Состояние иммунной системы при острых и хронических заболеваниях ЛОР-органов. В кн.: *Иммунодефицитные состояния* / Под ред. В.С. Смирнова, И.С. Фрейдлин. СПб.: Фолиант; 2000: 163—87.
20. Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) method. *Methods*. 2001; 25(4): 402-8.

ПОСТА ПИЛА

REFERENCES

1. Mal'tseva V.N., Mal'ceva V.N., Safronova V.G. The ambiguity of the role of the neutrophil in the genesis of tumors. *Tsitologiya*. 2009; 51(6): 467-4. (in Russian)
2. Nesterova I.V., Kolesnikova N.V., Chudilova G.A. Complex Three-Level Study of Neutrophilic Granulocytes with a Possible Diagnosis of IDC in Various Pathologies: *Methodical Rekomendatsion*. Krasnodar; 1996. (in Russian)
3. Nesterova I.V., Evglevskiy A.A., Fomicheva E.V. Features of the activation potential of the nuclei of neutrophils in health and disease. *Tsitokiny i vospalenie*. 2004; 3(2): 52-5. (in Russian)
4. Nesterova I.V., Kovaleva S.V., Chudilova G.A., Lomtadidze L.V., Evglevskiy A.A., Kolesnikova N.V. et al. Remodeling phenotype and functionality of neutrophils in patients with colorectal cancer influenced by G-CSF in the system in vitro. *Immunologiya*. 2012; 6: 306-11. (in Russian)
5. Nesterova I.V., Evglevskiy A. A., Fomicheva E.V., Kolesnikova N.V., Kovaleva S.V., Chudilova G.A. et al. Features of spontaneous and induced chromatin restructuring and functioning of the oxygen-cytotoxic mechanisms of neutrophil granulocytes in colorectal cancer. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal*. 2011; 5(3/4): 254-61. (in Russian)
6. Ashby J., Xuetong Shen. Chromatin remodelling beyond transcription: the INO80 and SWR1 complexes. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 2009; 10: 373-84.
7. Brinkmann V., Brinkmann V., Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps: Is immunity the second function of chromatin? *J. Cell Biol.* 2012; 198(5): 773-8.
8. Bird L., Bird L. Tumor immunology: Neutrophil plasticity. *Nature Rev. Immunol.* 2009; 9: 672-3.
9. Eid N.S., Kravill K.E., Lanks K.W. Heat-shock protein synthesis by human polymorphonuclear cells. *J. Exp. Med.* 1987; 165(5): 1448-52.
10. Fridlender Z. G., Fridlender Z. G., Jing S., Samuel K. et al. Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF- β : "N1" versus "N2" TAN. *Cancer Cell*. 2009; 16: 183-94.
11. Hamon V.F., Cossart P. Histone modifications and chromatin remodeling during bacterial infections. *Cell Host Microbe*. 2008; 4(2): 100-9.
12. Nesterova I. V., Kovaleva S.V., Chudilova G.A., Lomtadidze L.V., Evglevskiy A. A. The dual role of neutrophils in the realization of anti-tumor protection. *Immunologiya*. 2012; 5: 281-7. (in Russian)
13. Jack R.M., Fearon D.T. Selective synthesis of m RNA and proteins by human peripheral blood neutrophils. *J. Immunol.* 1988; 140(12): 4286—93.
14. Kobayashi S.D., Voyich J.M., Buhl C.L. et al. Global changes in gene expression by human polymorphonuclear leukocytes, during receptor-mediated phagocytosis: cell fate is regulated at the level of gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2002; 99(10): 6901-6.
15. Li B., Carey M., Workman O.L. The role of chromatin during transcription. *Cell*. 2007; 128(4): 707-19.
16. Mantovani A. The yin-yang of tumor-associated neutrophils. *Cancer Cell*. 2009; 8: 173-4.
17. Smale S.T., Fisher A.G. Chromatin structure and gene regulation in the immune system. *Annu. Rev. Immunol.* 2002; 20: 427-62.
18. Zhang X., Kluger Y., Nakayama Y. et al. Gene expression in mature neutrophils: early responses to inflammatory stimuli. *J. Leukoc. Biol.* 2004; 75(2): 358.
19. Gofman V.R., Smirnov V.S. The immune system in acute and chronic diseases of upper respiratory tract. In: *The Immuno-deficient State. [Immuno-defitsitnyye sostoyaniya]* / V.S. Smirnov, I.S. Frejdlin. Eds. St. Petersburg: Foliant; 2000: 163-87. (in Russian)
20. Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) method. *Methods*. 2001; 25(4): 402-8.

Received