

ИЗМЕНЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ НА ПОВЕРХНОСТИ НЕЙТРОФИЛОВ ДОНОРОВ МАРКЕРОВ АКТИВАЦИИ И КЛЕТОЧНОЙ АДГЕЗИИ В ОТВЕТ НА ВОЗДЕЙСТВИЕ АКТИВАТОРА НА ОСНОВЕ КЛЕТОК *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Белорусский государственный медицинский университет, научно-исследовательская часть, научная группа гемо- и лимфосорбции, г. Минск

Ключевые слова: маркеры активации, нейтрофилы, иммуномодуляция.

Резюме: В работе представлены результаты по изучению влияния активатора полученного из клеток *Saccharomyces cerevisiae* на экспрессию на поверхности нейтрофилов доноров маркеров клеточной адгезии (CD162, CD177) и активации клеток (CD69, CD281, CD282, CD286). В результате исследования показано, что выделенный из клеточного лизата дрожжей гликопротеин обладает способностью активировать нейтрофилы доноров, что подтверждается изменением экспрессии на поверхности клеток маркеров активации и молекул адгезии.

Resume: Abstract: In this work we present the results of studying the effect of the *Saccharomyces cerevisiae* activator on the expression of cell adhesion markers (CD162, CD177) and neutrophil activation (CD69, CD281, CD282, CD286). Our studying showed that the isolated Yeast glycoprotein has the ability to activate neutrophils, as evidenced by changes in expression on the cell surface of activation markers and adhesion molecules.

Актуальность. Иммунотерапия представляет интерес для врачей всех специальностей в связи с неуклонным ростом инфекционно-воспалительных заболеваний, склонных к хроническому и рецидивирующему течению на фоне низкой эффективности проводимой базовой терапии. В настоящее время выделяют по происхождению шесть основных групп иммуномодуляторов: микробные, тимические, костномозговые, цитокины, нуклеиновые кислоты и химически чистые [1].

Иммуномодуляторы микробного происхождения условно можно разделить на три поколения. Первым препаратом, разрешенным к медицинскому применению в качестве иммуностимулятора, была вакцина БЦЖ, обладающая выраженной способностью усиливать факторы как врожденного, так и приобретенного иммунитета. К микробным препаратам первого поколения можно отнести и такие лекарственные средства, как пирогенал и продигозан, представляющие собой полисахариды бактериального происхождения. В настоящее время из-за пирогенности и других побочных эффектов они применяются редко. К микробным препаратам второго поколения относятся лизаты (Бронхомунал, ИРС-19, Имудон, сравнительно недавно появившийся на российском фармацевтическом рынке препарат швейцарского производства Бронхо-Ваксом) и рибосомы (Рибомунил) бактерий, относящихся в основном к числу возбудителей респираторных инфекций *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Haemophilus influenzae* и др. Эти препараты имеют двойное назначение специфическое (вакцинирующее) и неспецифическое (иммуностимулирующее). К микробным препаратам третьего поколения можно отнести Ликопид, который состоит из природного

дисахарида – глюкозаминилмурамила и присоединенному к нему синтетического дипептида – L-аланил-D-изоглутамину. В организме главной мишенью для иммуномодуляторов микробного происхождения являются фагоцитарные клетки. Под влиянием этих препаратов усиливаются функциональные свойства фагоцитов (повышаются фагоцитоз и внутриклеточный киллинг поглощенных бактерий), возрастает продукция провоспалительных цитокинов, необходимых для инициации гуморального и клеточного иммунитета [1,2,3].

Не останавливаясь на характеристике иммуномодуляторов остальных групп целью данной работы являлось изучение биологической активности полученного из клеток *Saccharomyces cerevisiae* активатора. Данный активатор предполагается использовать в дальнейшем в качестве лиганда для мобилизации на твердый носитель и синтеза модуля для изучения возможности экстракорпоральной иммуномодуляции.

Цель: изучить влияние активатора полученного из клеток *Saccharomyces cerevisiae* на экспрессию на поверхности нейтрофилов доноров маркеров клеточной адгезии (CD162, CD177) и активации клеток (CD69, CD281, CD282, CD286).

Задачи: выделение и очистка гликопротеина клеточной стенки дрожжей, активация клеток крови гликопротеином дрожжей, оценка и анализ экспрессии маркеров активации и клеточной адгезии на нейтрофилах.

Материалы и методы. Для получения активатора клетки дрожжей суспензировали в 50 мл хлорида натрия. Затем проводили первичную механическую обработку суспензии дрожжевых клеток в физиологическом растворе на аппарате РЦД 160 (диспергатор). Диспергированную суспензию обрабатывали жидким азотом, затем измельчали в ступке керамическим пестиком, центрифугировали. Надосадок, содержащий гликопротеины и белки клеточной стенки дрожжевых клеток, отбирали, затем хроматографически выделяли фракцию обогащенную гликопротеинами. Полученную фракцию высушивали с помощью лиофильной сушки и хранили при +4-10°C. В эксперименте использовали 0,4 мл цельной гепаринизированной крови и 0,2 мл раствора полученного активатора в концентрации 2 мг/мл. Смесь инкубировали 90 минут при 37°C. Затем с помощью метода проточной цитофлуориметрии определяли экспрессию маркеров на поверхности нейтрофилов. Нормальный уровень экспрессии маркеров регистрировали после инкубации цельной крови с соответствующим объемом физиологического раствора (0,9% NaCl).

Результаты и их обсуждение. Как показали наши исследования, представленные в таблице 1, после взаимодействия гликопротеина дрожжей с нейтрофилами крови доноров происходит достоверное увеличение клеток, экспрессирующих маркер CD177. Молекула CD 177 является нейтрофил-специфическим антигеном человека. Согласно данным научной литературы под действием антигенов микроорганизмов и некоторых цитокинов экспрессия данной молекулы на поверхности нейтрофилов возрастает [1]. Существует также гипотеза об участии CD177 в развитии микробицидных реакций нейтрофилов. Кроме того, CD177 является молекулой клеточной адгезии,

принимающей активное участие в миграции лейкоцитов в очаг воспаления, опосредуя взаимодействие нейтрофилов с клетками эндотелия. Таким образом, выделенный нами активатор увеличивает процент нейтрофилов, способных к миграции в очаг воспаления через увеличение экспрессии CD177.

Таблица 1. Изменение процента нейтрофилов доноров, экспрессирующих на своей поверхности маркер активации и клеточной адгезии, в ответ на действие активатора

Маркер дифференцировки	Количество нейтрофилов, %	
	Физ. р-р	Гликопротеин
CD 69+	64,20 (53,80;85,20)	81,90 (53,00;89,70)
CD 162+	98,30 (93,90;99,90)	83,30 (59,90;92,30)*
CD 177+	87,80 (70,50;94,40)	99,20 (94,10;100,00)*
CD 281+282+	0,67 (0,54;1,05)	1,43 (1,21;2,96)*
CD 282+286+	0,78 (0,51;3,06)	2,98 (1,33;8,66)*

*- достоверная разница при статистическом анализе методом Вилкоксона, $p \leq 0,05$

Кластер дифференцировки CD162 - гликопротеиновый лиганд Р-селектина 1, PSGL-1 — трансмембранный белок на поверхности лейкоцитов, основной лигандселектинов. Играет важную роль в процессе задержки и роллинга лейкоцитов на поверхности эндотелия сосудов, начального этапа в связывании, секвестрации и трансмиграции лейкоцитов привоспалительной реакции. Белок находится на нейтрофилах, моноцитах и большинстве лимфоцитов[2]. Наши исследования показали, что после взаимодействия клеток крови с гликопротеином дрожжей, процент нейтрофилов, экспрессирующих CD162 достоверно снижается. Факт уменьшения CD162+ нейтрофилов говорит об активации клеток. По данным литературы экспрессия CD162 уменьшается при развитии воспаления, а также при активации ИЛ-6 и другими провоспалительными факторами [3].

Динамика экспрессии CD69 на поверхности нейтрофилов носит статистически недостоверный характер. В процессе исследования наблюдались разнонаправленные изменения. Вероятнее всего синтез и экспрессия CD69 опосредуется различными факторами и зависит во многом от индивидуальных особенностей организма. Изучение динамики экспрессии Толл-лайн рецепторов (ТЛР) на поверхности нейтрофилов показало, что при воздействии гликопротеина *Saccharomyces cerevisiae* на нейтрофилы происходит достоверное увеличение процента как CD281+282+-клеток, так и CD282+286+-клеток. Увеличение коэкспрессии ТЛР-1 (CD281) с ТЛР-2 (CD282), а также ТЛР-2 (CD282) с ТЛР-6 (CD286) говорит об активации нейтрофилов и о готовности данных клеток к распознаванию антигенов грамм-положительных и грамм-отрицательных бактерий, а также грибковых антигенов[4].

Выводы. Выделенный из клеточного лизата дрожжей гликопротеин обладает способностью активировать нейтрофилы доноров, что подтверждается изменением экспрессии на поверхности клеток маркеров активации и молекул адгезии. Гликопротеин *Saccharomyces cerevisiae* может быть в дальней-

шем использован для синтеза иммуномодуляторов, стимулирующих активность адаптивного иммунитета, а также лиганда для иммуномодуля с целью коррекции иммунодефицитов различного генеза.

Литература

1. Ulrich J.H., Sachs, Cornelia L., Andrei-Selmer / The neutrophil-specific antigen CD177 is a counter-receptor for platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31) // *The J. Of biological chemistry*, V.282, № 32, pp. 23603-23612
2. Zarbock A., Müller H., Kuwano Y., Ley K. PSGL-1-dependent myeloid leukocyte activation. *J. Leukoc. Biol.*, 2009, №86, pp.1119–24
3. Hashizume M., Higuchi Y., Uchiyama Y. / IL-6 plays an essential role in neutrophilia under inflammation // *Cytokine*, 2011, N54, p.92-99
4. Iwasaki A., Medzhitov R. / Toll-like receptor control of the adaptive immune responses // *Nature immunology*, 2004, V.5, N10, p.987-995

Репозиторий БГМУ