

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ФИЗИОЛОГИЯ. НАУЧНАЯ СТАТЬЯ
EXPERIMENTAL PHYSIOLOGY. RESEARCH ARTICLE

DOI: 10.22363/2313-0245-2020-24-4-304-314

Особенности влияний *in vitro* регуляторных цитокинов на фенотип субпопуляций CD62L⁺CD63⁻, CD62L⁺CD63⁺ и микробицидную активность нейтрофильных гранулоцитов пациентов с колоректальным раком

Г.А. Чудилова¹, И.В. Нестерова^{1,2}, С.В. Ковалева¹, Л.В. Ломтатидзе¹

¹Кубанский государственный медицинский университет, г. Краснодар, Российская Федерация

²Российский университет дружбы народов, Москва, Российская Федерация

Аннотация. *Актуальность.* Нейтрофильные гранулоциты (НГ) первыми из клеток иммунной системы мигрируют к опухоли и активно вовлекаются в реализацию полноценного противоопухолевого ответа через механизмы прямого киллинга клеток опухоли, внеклеточного лизиса (NET), так и через активацию антителозависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ), ингибирование ангиогенеза, инициации других клеток, обладающих противоопухолевой активностью. *Цель:* изучить влияние цитокинов IFN α , IFN γ , G-CSF на субпопуляции CD62L⁺CD63⁻ и CD62L⁺CD63⁺ и микробицидную активность НГ пациентов с колоректальным раком (КРР) в системе *in vitro*. *Материалы и методы.* Исследованы образцы периферической крови (ПК) 10 пациентов обоего пола 38–70 лет с впервые выявленным нелеченым КРР II–III стадии (группа исследования) и 10 условно-здоровых добровольцев (группа сравнения). Проведена оценка субпопуляций CD62L⁺CD63⁻НГ, CD62L⁺CD63⁺НГ методом проточной цитометрии (CYTOMICS FC500, Beckman Coulter, США), цитохимическими методами тестировались микробицидные функции НГ: активность NADPH-оксидазы, миелопероксидазы (МП), уровень катионного белка (КБ) в спонтанных тестах и при дополнительной нагрузке *S.aureus*. В обеих исследуемых группах изучалось влияние цитокинов IFN α , IFN γ , G-CSF на субпопуляции и микробицидную активность НГ в системе *in vitro*. Данные подвергали обработке непараметрическими методами статистики с помощью программ Microsoft Excel 2016 и StatPlus 2010, результаты представлены как медиана с интерквартильным размахом – Me (Q₁; Q₃). Значимость различий между группами рассчитывали с использованием U-критерия Манна–Уитни и критерия Вилкоксона. *Результаты.* Установлены особенности трансформации субпопуляций CD62L⁺CD63⁻НГ и CD62L⁺CD63⁺НГ ПК при КРР, позволяющие получить представление о способности НГ к роллингу и готовности активировать микробицидный арсенал, различные дефекты спонтанной и индуцированной микробицидной активности кислород-зависимых и кислород-независимых механизмов НГ. В эксперименте *in vitro* показаны эффекты влияния цитокинов на НГ при КРР, которые свидетельствуют о возможности регулирования рецепторных и микробицидных функций НГ, с другой стороны, позволяют говорить о дефектах восприятия НГ регулирующих стимулов, что подтверждается прогрессированием опухолевого роста.

Ключевые слова: колоректальный рак, нейтрофильные гранулоциты, субпопуляции, цитокины, микробицидные функции

© Чудилова Г.А., Нестерова И.В., Ковалева С.В., Ломтатидзе Л.В., 2020



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License
<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

Вклад авторов: Чудилова Г.А. – разработка методологии, проведение исследования, подготовка текста; Нестерова И.В. – разработка концепции, редактирование текста, утверждение окончательного варианта статьи; Ковалева С.В. – проведение исследования, проведение статистического анализа; Ломтатидзе Л.В. – проведение исследования.

Заявление о конфликте интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование: Исследование выполнено в рамках государственного задания Министерства здравоохранения Российской Федерации (проект № АААА-А18–118122690053–0).

Поступила 25.08.2020. Принята 11.09.2020.

Для цитирования: Чудилова Г.А., Нестерова И.В., Ковалева С.В., Ломтатидзе Л.В. Особенности влияний *in vitro* регуляторных цитокинов на фенотип субпопуляций CD62L⁺CD63⁻, CD62L⁺CD63⁺ и микробицидную активность нейтрофильных гранулоцитов пациентов с колоректальным раком тканей // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина. 2020. Т. 24. № 4. С. 304–314. DOI: 10.22363/2313-0245-2020-24-4-304-314

Regulatory cytokine effects *in vitro* on the phenotype of subpopulations CD62L⁺CD63⁻, CD62L⁺CD63⁺ and microbicidal activity of neutrophilic granulocytes in patients with colorectal cancer

G.A. Chudilova¹, I.V. Nesterova^{1,2}, S.V. Kovaleva¹, L.V. Lomtadze¹

¹Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

²Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russian Federation

Annotation. Relevance. Neutrophilic granulocytes (NG) are the first cells of the immune system to migrate to the tumor and are actively involved in the implementation of a full-fledged antitumor response through the mechanisms of direct killing of tumor cells, extracellular lysis (NET), and through the activation of antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC), inhibition of angiogenesis, initiation of other cells with antitumor activity. *The aim of the study* was to study the effect of cytokines IFN α , IFN γ , G-CSF on the CD62L⁺CD63⁻ and CD62L⁺CD63⁺ subsets and the microbicidal activity of NGs in patients with colorectal cancer (CRC) *in vitro*. *Materials and methods.* We studied samples of peripheral blood (PB) of 10 patients of both sexes 38–70 years old with newly diagnosed untreated CRC stage II–III (study group) and 10 healthy volunteers (comparison group). The subsets CD62L⁺CD63⁺ NG, CD62L⁺CD63⁻ NG were assessed by flow cytometry (CYTOMICS FC500, Beckman Coulter, USA), the microbicidal functions of NG were tested by cytochemical methods: activity of NADPH–oxidases, myeloperoxidase (MP), level of cationic protein (CP) in spontaneous tests and under additional stress of *S. aureus*. The effect of IFN α , IFN γ , G-CSF cytokines on subsets and the microbicidal activity of NG *in vitro* was studied in both study groups. Microsoft Excel 2016 and StatPlus 2010 were used for statistical processing of the obtained data using nonparametric tests: Me (Q1; Q3), Mann-Whitney U-test and Wilcoxon test. *Results.* The features of transformation of CD62L⁺CD63⁻ NG and CD62L⁺CD63⁺ NG subsets of PB in CRC have been established, that allows to get an idea of the NG ability to roll and readiness to activate the microbicidal arsenal, various defects of spontaneous and induced microbicidal activity of oxygen-dependent and oxygen-independent mechanisms of NG. The effects of cytokine influence on NG in CRC *in vitro* have been shown, which indicates the possibility of regulating the receptor and microbicidal functions of NG, and, on the other hand, suggests defects in NG perception of regulatory stimuli, that is confirmed by the progression of tumor growth.

Key words: colorectal cancer, neutrophilic granulocytes, subset, cytokines, microbicidal functions

Author contributions: Chudilova G.A. – development of methodology, research, preparation of the text; Nesterova I.V. – concept development, text editing, approval of the final version of the article; Kovaleva S.V. – conducting research, conducting statistical analysis; research, Lomtadze L.V. – research.

Conflict of interest statement. The authors declare no conflict of interest.

Financing. The study was funded by the Ministry of health of the Russian Federation (project no. AAAA-A18-118122690053-0). Received 25.08.2020. Accepted 11.09.2020.

For citation: Chudilova G.A., Nesterova I.V., Kovaleva S.V., Lomtadze I.V. Regulatory cytokine effects in vitro on the phenotype of subpopulations CD62L+CD63-, CD62L+CD63+ and microbicidal activity of neutrophilic granulocytes in patients with colorectal cancer. *RUDN Journal of Medicine*. 2020;24(4):304–314. DOI: 10.22363/2313-0245-2020-24-4-304-314

Введение

Ежегодно диагностируется более миллиона случаев колоректального рака (КРР) в мире [1]. В основном заболевание возникает спорадически и не связано с наследственной генетической мутацией. При изучении патогенеза злокачественности КРР ранее основное внимание уделялось исследованию особенностей поведения эпителиальных клеток, но в течение последнего десятилетия в фокусе внимания находится микроокружение опухоли, в частности, взаимодействие стромальных, эпителиальных и иммунных клеток [2, 3]. Незатихающий интерес исследователей к НГ связан с их важной и противоречивой ролью в развитии рака [4–7]. Современные научные данные показывают, что НГ являются активными участниками противоопухолевой защиты. НГ первыми мигрируют к опухоли (опухольассоциированные ТАН) под влиянием хемокинов CXCL1 (KC), CXCL2 (MIP-2), CXCL5 (ENA-78), CXCL6 (GCP-2), CXCL8 (IL-8), цитокинов (TNF α и IFN γ), ростовых факторов (G-CSF, GM-CSF), LTB $_4$, PAF, лигандов рецепторов комплемента (C5a, C3a), N-формилпептидов (FPR-1, FPR-2), которые являются хемоаттрактантами, и молекул адгезии (ICAM-1 и PECAM-1) на клеточной поверхности НГ и эндотелиальных клетках [8–10]. НГ способны проявлять противоопухолевую активность, рекрутируя и активируя клетки иммунной системы (Т-клетки, НК и дендритные клетки) [2, 11].

НГ продуцируют ряд антимикробных медиаторов, которые обладают потенциальной онкоцидной активностью, включая активные формы кислорода (АФК), миелопероксидазу (МП), перекись водорода (H $_2$ O $_2$) и протеазы [12]. Супероксидные радикалы, образующиеся при активации NADPH-оксидазы, оказывают цитопатическое действие. В дополнение к H $_2$ O $_2$ -зависимой «спонтанной» цитотоксичности, НГ являются мощными медиаторами Fc-рецептор-зависимой АЗКЦ против опсонизированных антигенами

опухолевых клеток. Литический потенциал в реакциях АЗКЦ связан с экзоцитозом азурофильных гранул и активностью их основного компонента-МП [13].

Доказано, что про- и противоопухолевая активность НГ определяется микроокружением, т.е. средой, которую создают комплексные цитокиновые и хемокиновые влияния. При этом цитокины и хемокины продуцируются как самой опухолью, так и клетками иммунной системы, проникающими в опухоль. НГ способны трансформировать свой фенотип и функции в ответ на изменения цитокинового (G-CSF, IFN γ , TNF α) и хемокинового (CCL-2, CCL-5, CXCL5 и IL-8), окружения, что способствует их преобразованию в НГ с противоопухолевыми свойствами [14–16]. Изменение архитектоники поверхностных цитоплазматических рецепторов мембраны НГ связано с их праймированием и осуществлением эффекторных функций. У пациентов с раковыми заболеваниями (эпителиальные карциномы) описаны нарушения мобилизации НГ (дефекты хемотаксиса), ассоциированные со снижением уровня экспрессии рецепторов, приводящие к дефектам АЗКЦ [17].

Процессы адгезии, миграции и хемотаксиса инициируют активацию и полноценное функционирование НГ. Так рецептор адгезии CD62L (селектин L, LAM-1, LECAM-1) участвует в роллинге и перемещении НГ в очаг воспаления или опухоль. Рецептор CD63 (тетраспанин, ME491, LAMP-3, NK1-C3) выполняет регуляторную роль белков-посредников передачи сигналов активации, роста и подвижности НГ. При экспрессии CD63 на поверхностной цитоплазматической мембране НГ осуществляется кратковременный сигнал усиливающий адгезивную активность CD11/CD18. Также известно, что CD63 является маркером азурофильных гранул, по уровню экспрессии которых можно судить об интенсивности реализации МП. Было описано, что CD63 играет критическую роль во многих биологических процессах, включая опухолевый рост и метастазирование

при нескольких типах рака. Показано, что снижение экспрессии белка CD63 – предиктор неблагоприятного прогноза при раке пищевода [18]. Выявлено, что повышенная экспрессия CD63 способствует ингибированию злокачественности плоскоклеточного рака языка (TSCC) и метастазированию в лимфатические узлы, что может иметь значение в прогнозировании исходов заболевания, в том числе при проведении генной терапии пациентов с TSCC [19].

Однако все еще недостаточно сведений о роли НГ при развитии КРР в сопоставлении с особенностями фенотипа их функционально-значимых субпопуляций ПК и возможности воздействия на рецепторные и микробицидные функции клеток различными цитокинами, что с нашей точки зрения представляет несомненный интерес.

Целью исследования явилось изучение влияния цитокинов IFN α , IFN γ , G-CSF на субпопуляции CD62L⁺CD63⁻ и CD62L⁺CD63⁺ и микробицидную активность НГ пациентов с КРР в системе *in vitro*.

Материалы и методы

Исследованы образцы ПК 10 пациентов (38–70 лет) с впервые выявленным КРР (КРР II–III стадии развития неопластического процесса, с гистологически подтвержденной аденокарциномой), не получавшие ранее лучевой терапии, курсов полихимиотерапии, иммунотерапии перед оперативным вмешательством, и образцы ПК 10 условно-здоровых добровольцев (38–70 лет) – группа сравнения.

Все пациенты и условно-здоровые добровольцы подписали информированное согласие на участие в исследовании и обработку персональных данных. Исследование было одобрено локальным этическим комитетом Кубанского государственного медицинского университета.

В исследуемых группах методом проточной цитометрии (CYTOMICS FC500, Beckman Coulter, США) определялись субпопуляции CD62L⁺CD63⁺НГ, CD62L⁺CD63⁻НГ (%НГ и уровень экспрессируемых молекул (MFI)), цитохимическими методами тестировались микробицидные функции: активность NADPH-оксидаз, МП, уровень неферментного катионного белка (КБ) в спонтанных тестах и при дополнительной нагрузке *S.aureus* (штамм 209).

В нагрузочных тестах *in vitro* исследовалось влияние цитокинов IFN α , IFN γ , G-CSF и мЦТ (цитокинный микст, содержащий изучаемые цитокины в соотношении 1:1:1) на субпопуляции НГ CD62L⁺CD63⁺, CD62L⁺CD63⁻, и микробицидную цитотоксическую (NADPH-оксидаза, МП, КБ) активность НГ. Для этого ПК пациентов с КРР и условно-здоровых взрослых лиц инкубировали (60 мин при T-37°C) с цитокинами в концентрации 10⁻⁷ г/л.

Данные подвергали обработке непараметрическими методами статистики с помощью программ Microsoft Exel 2016 и StatPlus 2010, результаты представлены как медиана с интерквартильным размахом – Me (Q₁; Q₃). Значимость различий между группами рассчитывали с использованием U-критерия Манна–Уитни и критерия Вилкоксона. Различия показателей полагали статистически обоснованными с ошибкой 1 рода p<0,05 (критерия Манна–Уитни).

Результаты и обсуждение

При сравнении уровня лейкоцитов и НГ в исследуемых группах не выявлено значимых различий в показателях, как общего количества лейкоцитов у пациентов с КРР – 5,6 (5,06; 6,67) x10⁹/л против 4,75 (4,02; 5,1) x10⁹/л в группе сравнения, так и относительного 66 (56,5; 76,75)% против 55,5 (54,25; 59,75)% в группе сравнения и абсолютного 3,54 (2,83; 5,29) x10⁹/л против 2,85 (2,30; 2,86) x10⁹/л в группе сравнения, количества НГ (p>0,05) (Рис. 1).

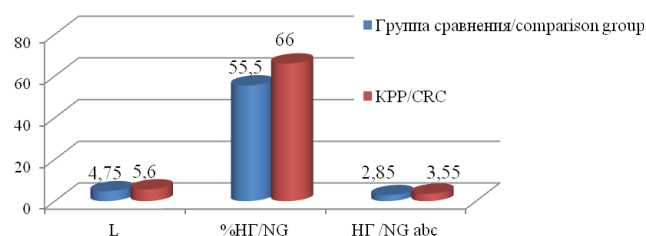


Рис. 1. Общее количество лейкоцитов и нейтрофильных гранулоцитов в периферической крови пациентов с колоректальным раком (КРР).

Fig. 1. The total number of leukocytes and neutrophilic granulocytes in the peripheral blood of patients with colorectal cancer (CRC).

Детекция поверхностных мембранных рецепторов CD62L и CD63 выявила что, у условно-здоровых взрослых лиц 93,9(91,08;94,48)% НГ представлены субпопуляцией CD62L⁺CD63⁻НГ с MFI CD62L – 9,47(8,2;11,98)

и в 4,4(3,3;5,8)% – субпопуляцией CD62L⁺CD63⁺НГ, при этом уровень экспрессии CD62L по MFI составил 4,4 (3,33; 6,56), и уровень экспрессии CD63 по MFI – 4,89 (3,99; 6,98). (Таблица 1).

Таблица 1

Субпопуляции CD62L⁺CD63⁺ и CD62L⁺CD63⁻ нейтрофильных гранулоцитов у пациентов с колоректальным раком и условно-здоровых взрослых лиц (Me(Q₁; Q₃))

Table 1

Subsets of CD62L⁺CD63⁺ and CD62L⁺CD63⁻ neutrophilic granulocytes in patients with colorectal cancer and healthy adults (Me (Q₁; Q₃))

Группа/ Group	CD62L ⁺ CD63 ⁺ НГ /(NG)			CD62L ⁺ CD63 ⁻ НГ/(NG)	
	НГ,% NG,%	MFI CD62L	MFI CD63	НГ,% NG,%	MFI CD62L
Группа сравнения/ Comparison group	4,4 (3,3; 5,8)	4,4 (3,33;6,56)	4,89 (3,99; 6,98)	93,9 (91,08; 94,48)	9,47 (8,2; 11,98)
КРР/ CRC	33,55* (16,6;63,3)	3,14 (2,93;4,45)	10,45* (9,04;12,5)	61,5* (34,03;78,90)	10,75 (9,19;13,15)

Примечание:* – различия показателей пациентов с КРР по сравнению с условно-здоровыми взрослыми статистически обоснованы с ошибкой 1 рода p<0,05 (критерий Манна–Уитни).

Note: * – the differences in indicators of patients with CRC compared to conventionally healthy adults are statistically substantiated with a type 1 error p <0.05 (Mann–Whitney test).

При КРР отмечается значительное увеличение в 7,62 раза% НГ с активированным фенотипом CD62L⁺CD63⁺НГ на фоне повышения в 2,13 раза MFI CD63 (p<0,05) и уменьшения уровня экспрессии по MFI CD62L – в 1,4 раза (p>0,05), при этом выявлено снижение количества НГ субпопуляции

CD62L⁺CD63⁻НГ с неменяющимся уровнем экспрессии CD62L рецептора (Рис. 2).

Установлено, что при КРР имеют место различные дефекты кислород-зависимых и кислород-независимых механизмов НГ (Рис. 3).

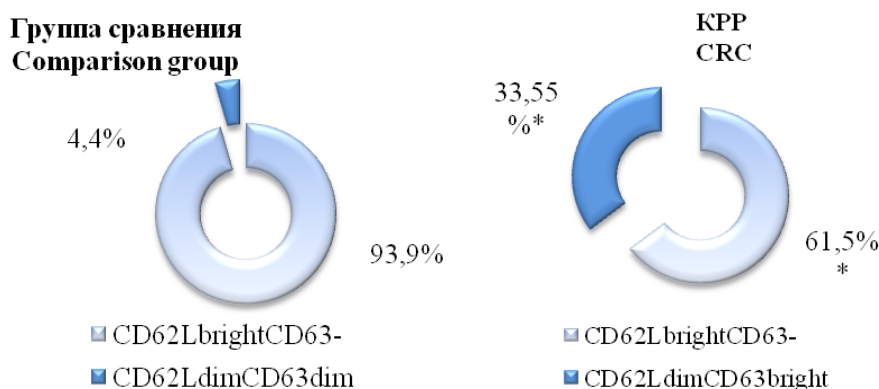


Рис. 2. Содержание и фенотипические особенности субпопуляций CD62L⁺CD63⁺ и CD62L⁺CD63⁻ нейтрофильных гранулоцитов у пациентов с колоректальным раком и условно – здоровых взрослых лиц

Примечание:* – различия показателей пациентов с КРР по сравнению с условно-здоровыми взрослыми статистически обоснованы с ошибкой 1 рода p<0,05 (критерий Манна–Уитни).

Fig. 2. Content and phenotypic features of subsets CD62L⁺CD63⁺ and CD62L⁺CD63⁻ neutrophilic granulocytes in patients with colorectal cancer and healthy adults

Note: * – the differences in indicators of patients with CRC compared to conventionally healthy adults are statistically substantiated with a type 1 error p <0.05 (Mann–Whitney test).

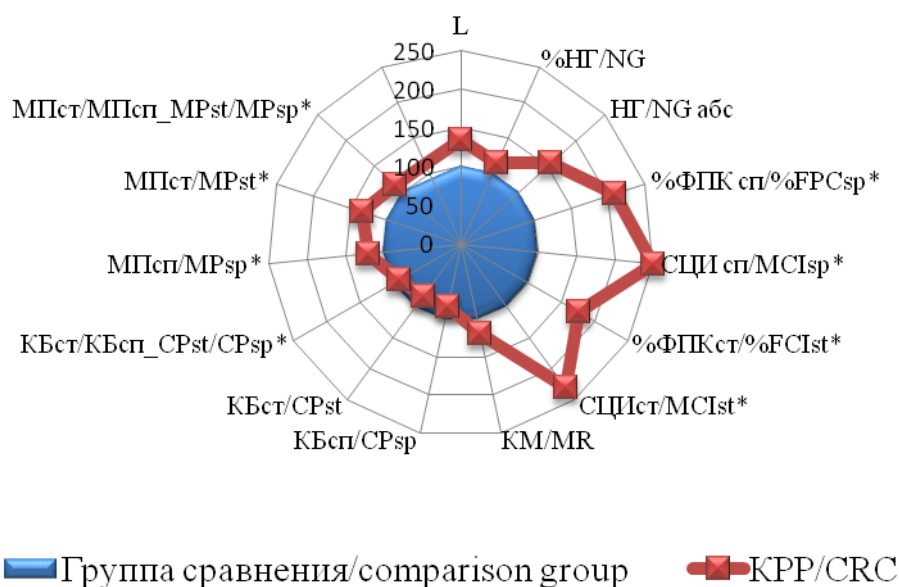


Рис. 3. Состояние микробицидной системы нейтрофильных гранулоцитов при колоректальном раке (процент от показателей условно-здоровых лиц)

Fig. 3. The state of the microbicidal system of neutrophilic granulocytes in colorectal cancer (% of the indicators of healthy individuals)

*Примечание:** – различия показателей пациентов с КРР по сравнению с условно-здоровыми взрослыми (контроль) статистически обоснованы с ошибкой 1 рода $p < 0,05$ (критерий Манна–Уитни).

Note: * – the differences in indicators of patients with CRC compared to conventionally healthy adults are statistically substantiated with a type 1 error $p < 0,05$ (Mann–Whitney test).

Так, показано, что у пациентов с КРР активность NADPH-оксидаз, оцениваемая в NBT спонтанном – тесте (%ФПК, СЦИ) была в 2,1 раза выше, чем у условно-здоровых субъектов ($p < 0,05$) (Рис. 3). При дополнительной нагрузке БАГ в стимулированном NBT-тесте сохранялся адекватный ответ, что отразилось в показателях КМ – 2,79 (2,18; 2,97) ($p > 0,05$) (Рис. 3).

При этом при КРР уровень КБ в НГ был ниже, чем у условно-здоровых лиц – 2,14 (0,63; 1,70) против 2,56 (2,36; 2,67) в группе сравнения ($p < 0,05$). Последующая нагрузка БАГ, вызывала дополнительное расходование КБ ($p < 0,05$), что отразилось в снижении значения КР – 0,68 (0,66; 0,70) ($p < 0,05$).

В противоположность этому у пациентов с КРР наблюдалась повышенная активность МП – 2,74 (2,66; 2,80) против 2,26 (2,09; 2,41) в группе сравнения ($p < 0,05$), но отсутствовал адекватный ответ

на антигенную нагрузку *S. aureus* in vitro. Выявлено снижение интенсивности расходования МП после нагрузки БАГ, по сравнению с условно-здоровыми взрослыми субъектами.

Таким образом, показано, что снижение количества НГ и/или трансформация уровней экспрессии соответствующих мембранных маркеров приводят к нарушениям миграции НГ, недостаточны для полноценного проявления прямой и АЗКЦ, а также для реализации микробицидной киллинговой функции, о чем свидетельствует прогрессирующее злокачественное роста.

Под влиянием цитокинов $IFN\alpha$, $IFN\gamma$, G-CSF, МЦТ в системе in vitro отмечается усиление активации НГ, что проявляется значимым увеличением (в 1,7–2 раза) количества НГ субпопуляции $CD62L^+CD63^+НГ$ по сравнению с базовым уровнем, установленным у пациентов с КРР ($p < 0,05$), и уве-

личением в 13 раз по сравнению с содержанием у условно – здоровых лиц ($p < 0,05$). Кроме того, показано снижение количества НГ субпопуляции $CD62L^+CD63^-$ НГ в 2 раза по сравнению с уровнем у пациентов с КРР до инкубации с цитокинами ($p < 0,05$) и в 3,5 раза ниже, чем в группе сравнения ($p < 0,05$). При этом MFI $CD62L$ и MFI $CD63$ не из-

менились и не отличались от таковых у пациентов с КРР и у условно-здоровых лиц.

Необходимо отметить, что при КРР эффекты влияния $IFN\alpha$ и $IFN\gamma$ были установлены только в 40–50 % случаев ($p_1 < 0,05$; $p_2 < 0,05$ соответственно), тогда как в 50–60 % случаев изучаемые показатели не отличались от фонового уровня при КРР (Рис. 4).

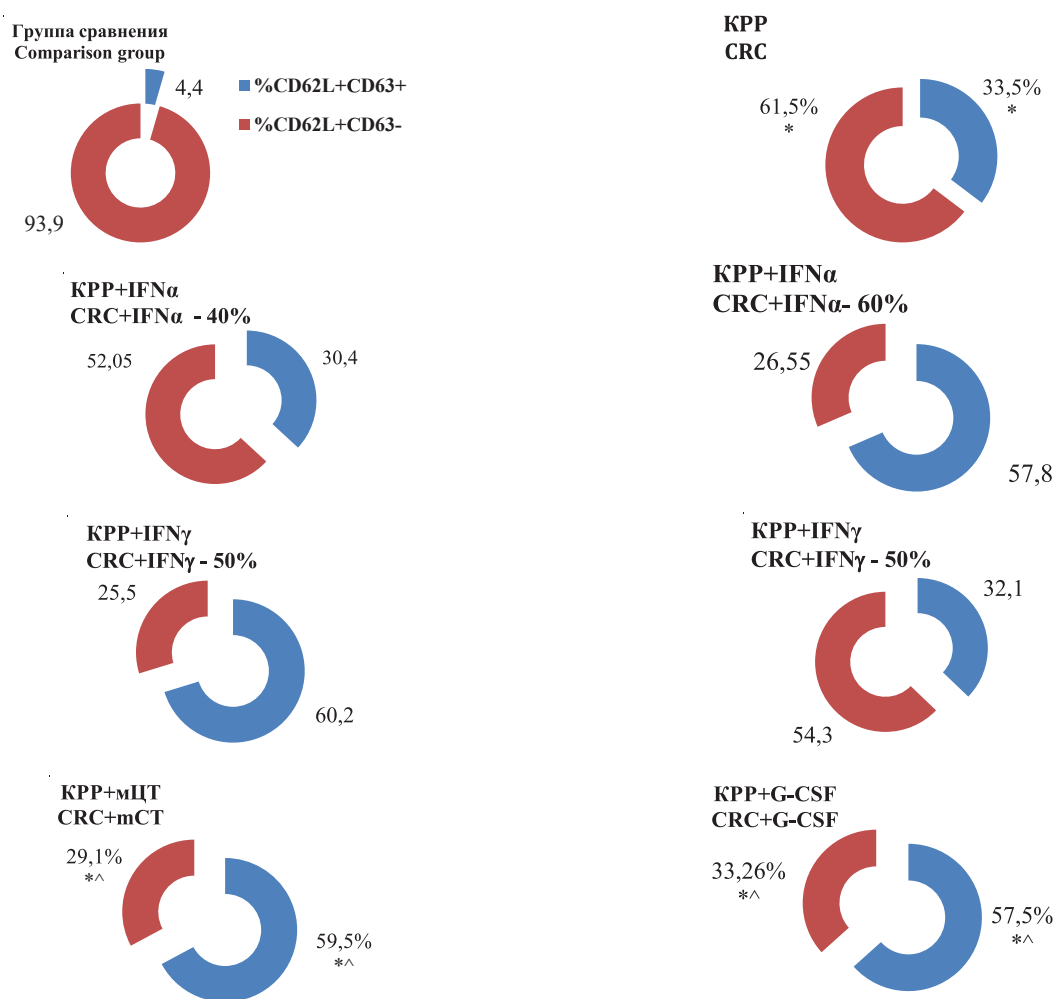


Рис. 4. Влияние цитокинов на субпопуляции $CD62L^+CD63^+$ и $CD62L^+CD63^-$ нейтрофильных гранулоцитов у пациентов с колоректальным раком

Примечание: * – различия показателей от условно-здоровых взрослых статистически обоснованы с ошибкой 1 рода $p < 0,05$ (критерий Манна–Уитни)

^ – различия показателей пациентов с колоректальным раком до инкубации и после инкубации с цитокинами статистически обоснованы с ошибкой 1 рода $p < 0,05$ (критерий Манна–Уитни).

Fig. 4. Influence of cytokines on subpopulations $CD62L^+CD63^+$ and $CD62L^+CD63^-$ neutrophilic granulocytes in patients with colorectal cancer

Note: * – the differences in the parameters of healthy adults are statistically substantiated with an error of type 1 $p < 0.05$.

^ – differences in indicators of patients with colorectal cancer before incubation and after incubation with cytokines are statistically substantiated with a type 1 error $p < 0.05$

Модулирующие эффекты изучаемых цитокинов отмечались и при анализе показателей кислород-зависимых и кислород-независимых механизмов НГ, ассоциированных с реагированием на цитокиновый стимул рецепторного аппарата НГ для обеспечения адекватного ответа.

Так, отмечено отсутствие влияния $IFN\alpha$ на активность NADPH-оксидаз у пациентов с КРР как в спонтанном, так и в стимулированном NBT-тестах (Рис. 5). Ответы НГ, зарегистрированные по показателям % ФПК и СЦИ, на цитокины $IFN\gamma$, G-CSF и МЦТ и при нагрузке БАГ отличались по интенсивности.

Под влиянием $IFN\gamma$ и G-CSF в 40 % случаев (1 группа) наблюдалось усиление активности NADPH-оксидаз (% ФПК и СЦИ) как в спонтанном, так стимулированном NBT-тесте. При этом было выявлено влияние $IFN\gamma$, G-CSF в 60 % случаев (2 группа), которое сопровождалось угнетением синтеза активных форм кислорода. Следует отметить сохранение способности к развитию адекватной реакции на БАГ в NBT-стимулированном тесте при воздействии $IFN\gamma$ и G-CSF (Рис. 5).

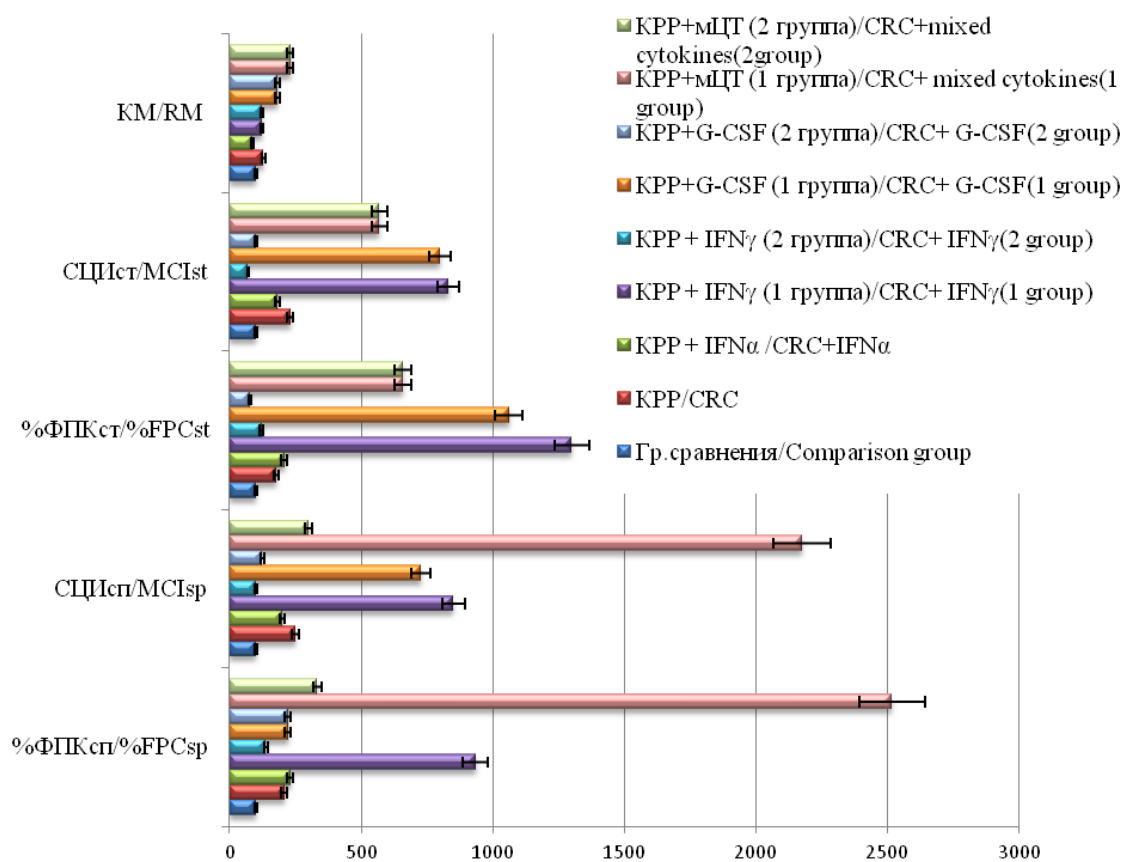


Рис. 5. Влияние цитокинов на активность кислородзависимой микробицидной системы (NADPH-оксидаза) нейтрофильных гранулоцитов в системе in vitro при колоректальном раке.

Fig. 5. Influence of cytokines on the activity of the oxygen-dependent microbicidal system (NADPH oxidase) of neutrophilic granulocytes in the in vitro system for colorectal cancer.

При оценке показателей % ФПК и СЦИ в NBT спонтанном – тесте показано, что уровень активности NADPH-оксидаз в НГ у пациентов с КРР после инкубации с мЦТ не изменился (Рис. 5). Влияние мЦТ приводило к изменению ответа на дополнительную нагрузку БАГ. Так, в 1-й группе отмечено значительное, более чем в 11 раз, повышение активности NADPH-оксидаз, регистрируемое как при

анализе % ФПК ($p < 0,05$), так и по СЦИ ($p < 0,05$); во 2-й группе пациентов выявлено отсутствие ответа на нагрузку БАГ (Рис. 5).

Инкубация НГ лиц, страдающих КРР с $IFN\alpha$, $IFN\gamma$, G-CSF и мЦТ позволила выявить разные эффекты на уровень КБ и их реализацию при дополнительной нагрузке БАГ (Таблица 4).

Таблица 4

Влияния $IFN\alpha$, $IFN\gamma$, G-CSF и мЦТ на микробицидную функцию НГ при колоректальном раке в системе in vitro (Ме (Q1; Q3))

Table 4

Effects of $IFN\alpha$, $IFN\gamma$, G-CSF and mCT on the microbicidal function of NG in colorectal cancer in an in vitro system (Me (Q1; Q3))

Группа group	КБсп CPsp	КБст CPst	КБст/КБсп CPsp/CPst	МПсп MPsp	МПст MPst	МПст/МПсп MPst/MPsp
Группа сравнения Comparison group	2,56 (2,36; 2,69)	1,78 (1,61; 2,11)	0,75 (0,70; 0,83)	2,26 (2,1; 2,41)	1,68 (1,4; 1,86)	0,74 (0,69; 0,81)
КРР CRC	2,14 (0,63; 1,70)	1,48 (1,29; 1,76)	0,68 (0,66; 0,70)	2,74 (2,6; 2,80)	2,27 (2,0; 2,30)	0,86 (0,85; 0,91)
КРР+ $IFN\alpha$ / CRC+ $IFN\alpha$	2,07 (2,01; 2,18)	1,88* (1,73; 2,0)	0,90* (0,78; 1,00)	2,46 (2,18; 2,79)	1,93 (1,61; 2,38)	0,85 (0,82; 0,98)
КРР+ $IFN\gamma$ / CRC+ $IFN\gamma$	1,97 (1,93; 2,19)	1,16* (0,45; 1,2)	0,59 (0,56; 0,74)	2,48* (2,4; 2,57)	2,28 (2,08; 2,5)	0,92* (0,88; 0,94)
КРР+G-CSF/ CRC+ G-CSF	1,91 (1,76; 2,09)	1,76 (1,61; 1,98)	0,92* (0,88; 1,10)	2,34* (2,2; 2,58)	1,90 (1,79; 2,01)	0,78 (0,74; 0,99)
КРР+мЦТ/ CRC+mCT	1,65 (1,41; 1,87)	0,93* (0,87; 1,21)	0,55* (0,50; 0,69)	2,23* (2,12; 2,4)	1,77* (1,62; 2,02)	0,78 (0,71; 1,09)

Примечание: * – различия показателей пациентов с колоректальным раком до инкубации и после инкубации с цитокинами статистически обоснованы с ошибкой 1 рода $p < 0,05$ (критерий Манна–Уитни).

Note: * – differences in indicators of patients with colorectal cancer before incubation and after incubation with cytokines are statistically substantiated with a type 1 error $p < 0.05$.

Так, выявлено, что инкубация с мЦТ, вызвала максимальное снижение уровня КБ ($p < 0,05$), в то же время значимых различий по монодействию $IFN\alpha$, $IFN\gamma$, G-CSF на уровень КБ не отмечалось ($p > 0,05$). После инкубации НГ с изучаемыми цитокинами нагрузка S. aureus вызывала дополнительный расход КБ. При этом наибольший эффект наблюдался при работе с мЦТ ($p < 0,05$), а наименьший – при $IFN\alpha$ ($p > 0,05$).

При этом оценка влияния цитокинов свидетельствовала о внутриклеточном и/или трансмембранном расходовании МП на фоне увеличения количества $CD62L^+CD63^+$ НГ.

В частности, инкубация НГ при КРР с $IFN\gamma$, G-CSF и мЦТ приводила к снижению активности МП ($p < 0,05$), более выраженному при мЦТ, при этом

нагрузка БАГ вызывала дополнительный расход МП во всех случаях ($p < 0,05$) (Таблица 4).

Таким образом, выявленное нарушение цитопатических свойств МП, КБ, NADPH-оксидаз при КРР и отсутствие ответа на воздействие регуляторных цитокинов может являться причиной снижения противоопухолевых свойств НГ.

В ходе проведенного исследования нами установлены особенности трансформации субпопуляций $CD62L^+CD63^-$ НГ и $CD62L^+CD63^+$ НГ ПК у пациентов с КРР, дающие представление о способности клетки к миграции, роллингу, реализации микробицидных функций.

Выявлено, что при КРР количество НГ субпопуляции $CD62L^+CD63^-$ было значимо ниже, но MFI

CD62L не отличался от значений условно-здоровых взрослых лиц. При этом в ПК отмечалось, увеличенное в 7,6 раз содержание активированной субпопуляции CD62L⁺CD63⁺НГ с высоким уровнем MFI CD63 и низким MFI CD62L по отношению к показателям группы сравнения. Такой фенотип связан с транслокацией содержимого цитоплазматических гранул на клеточную поверхность, что может приводить с одной стороны к повышенной реактивности МП, а с другой стороны в сочетании со снижением MFI CD62L может быть сопряжено с процессом апоптоза [20]. У пациентов с КРР наблюдалась повышенная активность МП в спонтанном тесте по отношению к показателям в группе сравнения и отсутствие адекватного ответа в тесте с антигенной нагрузкой *S. aureus* in vitro.

Исследование влияния цитокинов IFN α , IFN γ , G-CSF, мЦТ на НГ пациентов с КРР позволило выявить однонаправленные активирующие эффекты: увеличилось количество субпопуляции CD62L⁺CD63⁺НГ. При этом важно отметить, что уровень экспрессии MFI CD62L и MFI CD63 не менялся по сравнению с исходными значениями интактном контроле.

При этом инкубация с IFN α не влияла на активность МП, а IFN γ , G-CSF и мЦТ приводили к снижению активности МП, более значимому при мЦТ ($p < 0,05$).

В литературе отмечаются противоречивые данные о роли НГ с повышенной активностью МП в колоректальных опухолях [21–23]. В двух исследованиях показано, что инфильтрация опухоли МП⁺НГ коррелирует с воспалением толстой кишки, и что такие МП⁺НГ являются индикатором риска развития КРР [22]. В то же время позднее Droeser R.A. и соавторы [21] показали, что сильная инфильтрация опухоли CD15⁺МП⁺НГ была связана с лучшим прогнозом течения и исхода КРР [24].

Таким образом, установлены варианты трансформации субпопуляций CD62L⁺CD63⁺НГ, CD62L⁺CD63⁺НГ, выявлены дефекты реализации цитотоксического и биоцидного потенциала НГ, истощение резервных адаптационных возможностей и отсутствие адекватного ответа на дополнительную антигенную нагрузку и способности реагирования на регуляторные цитокины. По-видимому, возникновение таких дефектов функционирования НГ

приводит к снижению противоопухолевой активности НГ и способствует развитию КРР.

Выводы

1. При КРР отмечено значительное, в 7,6 раза, повышение количества НГ активированной субпопуляции CD62L⁺CD63⁺ с трансформированным фенотипом. Так, если у условно-здоровых субъектов только 4,4 % НГ были позитивны по CD62L и CD63 и имели фенотип CD62L^{dim}CD63^{dim}, то у пациентов с КРР 33,5 % НГ имели трансформированный фенотип CD62L^{dim}CD63^{bright}, который отличала высокая плотность экспрессии мембранного CD63.

2. В системе in vitro выявлены однонаправленные активирующие эффекты влияний цитокинов IFN α , IFN γ , G-CSF, мЦТ на НГ пациентов с КРР: отмечено еще более значимое увеличение в 1,7–2 раза активированной субпопуляции CD62L⁺CD63⁺НГ по сравнению с уровнем, установленным у пациентов с КРР. При этом уровень плотности экспрессии молекул CD62L и CD63, оцениваемый по MFI, не менялся.

3. У пациентов с КРР выявлены дефекты спонтанной и индуцированной активности кислород-зависимых и кислород-независимых механизмов микробицидной и цитотоксической активности НГ, ассоциированные с истощением резервных адаптационных возможностей НГ.

4. Отсутствие реагирования NADPH-оксидазы и КБ на инкубацию с цитокинами позволяют говорить о дефектах восприятия НГ воздействия регуляторных цитокинов.

5. Появление у пациентов с КРР субпопуляции НГ с трансформированным фенотипом CD62L^{dim}CD63^{bright} в сочетании с комбинированными функциональными дефектами НГ ассоциировано со снижением противоопухолевой активности НГ, о чем свидетельствует развитие на этом фоне опухолевого процесса в колоректальной зоне.

Библиографический список / References

1. *Cancer Research UK*. Cancer statistics. available at: www.cancerresearchuk.org. Access date: 10/08/2020.
2. Mantovani A., Romero P., Palucka A.K., Marincola F.M. Tumour immunity: effector response to tumor and role of the

- microenvironment. *Lancet*. 2008; 371:771–783.
3. McLean M.H., Murray G.I., Stewart K.N., Norrie G., Mayer C., Hold G.L., Thomson J., Fyfe H., Mowat N.A., Drew E.J., El-Omar M.E. The inflammatory microenvironment in colorectal neoplasia. *PLoS One*. 2011;6(1): e15366. doi:10.1371/journal.pone.0015366.
 4. Swierczak A., Mouchemore K.A., Hamilton J.A., Anderson R.L. Neutrophils: important contributors to tumor progression and metastasis. *Cancer Metastasis*. 2015;34:735–751. doi:10.1007/s10555-015-9594-9
 5. Sionov R.V., Fridlender Z.G., Granot Z.. The multifaceted roles neutrophils play in the tumor microenvironment. *Cancer Microenviron*. 2015;8:125–158. doi:10.1007/s12307-014-0147-5
 6. Coffelt S.B., Wellenstein M.D., de Visser K.E. Neutrophils in cancer: neutral no more. *Nat. Rev. Cancer*. 2016;16:431–446. doi:10.1038/nrc.2016.52
 7. Mishalian I., Granot Z., Fridlender Z.G.. The diversity of circulating neutrophils in cancer. *Immunobiology*. 2017;222:82–88. doi:10.1016/j.imbio.2016.02.001
 8. Kabayashi Y. The role of chemokines in neutrophil biology *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*. 2008;13:2400–2407.
 9. Khajah M., Millen B., Cara D.C., Waterhouse C., Mc Cafferty D. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF): a chemoattractive agent for murine leukocytes in vivo. *Journal of Leukocyte Biology*. 2011; 89 (6):945–953.
 10. Dumitru C.A., Lang S., Brandau S. Modulation of neutrophil granulocytes in the tumor microenvironment: Mechanisms and consequences for tumor progression. *Seminars in Cancer Biology*. 2013;23:141–148.
 11. Mishalian I., Granot Z., Fridlender Z.G. The diversity of circulating neutrophils in cancer. *Immunobiology*. 2017;222 (1):82–88.
 12. Zhang X., Zhang W., Yuan X., Fu M., Qian H., Xu W. Neutrophils in cancer development and progression: Roles, mechanisms, and implications (Review). *International journal of oncology*. 2016; 49(3):857–867.
 13. Lau D., Mollnau H., Eiserich J.P., Freeman B.A., Daiber A., Gehling U.M., Brümmer J., Rudolph V., Münzel T., Heitzer T., Meinertz T., Baldus S. Myeloperoxidase mediates neutrophil activation by association with CD11b/CD18 integrins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2005;102 (2):431–436.
 14. Mantovani A. The yin-yang of tumor-associated neutrophils. *Cancer Cell*. 2009;8:173–174.
 15. Levy O. Innate immunity of the newborn: basic mechanisms clinical correlates. *Nature reviews Immunology*. 2007;7(5): 379–390.
 16. Lin A., Lore K. Granulocytes: New Members of the Antigen-Presenting Cell Family. *Frontiers in Immunology*. 2017;11. doi:10.3389/fimmu.2017.01781
 17. Dallegri F., Ottonello L., Ballesterro A., Patrizia Dapino, F. Ferrando, F. Patrone, C. Sacchetti Tumor cell lysis by activated human neutrophils: analysis of neutrophil-delivered oxidative attack and role of leukocyte function-associated antigen. *Inflammation*. 1991; 1(15):15–30.
 18. Lai X., Gu Q., Zhou X., Feng W., Lin X., He Y., Cao J., Liu P., Zhang H., Zheng X. Decreased expression of CD63 tetraspanin protein predicts elevated malignant potential in human esophageal cancer. *Oncol Lett*. 2017;13(6):4245–4251. DOI: 10.3892/ol.2017.6023.
 19. Liu W.H., Li X., Zhu X.L., Hou M.L., Zhao W. CD63 inhibits the cell migration and invasion ability of tongue squamous cell carcinoma. *Oncol Lett*. 2018;(6): 9033–9042. DOI: 10.3892 / ol.2018.8499.
 20. Beinert T., Munzing S., Possinger K., Krombach F. Increased expression of the tetraspanins CD53 and CD63 on apoptotic human neutrophils. *Journal of Leukocyte Biology*. 2000; 67:369–373.
 21. Drosner R.A., Hirt C., Eppenberger-Castori S., Zlobec I., Viehl C.T., Frey D.M., Nebiker C.A., Rosso R., Zuber M., Amicarella F. High myeloperoxidase positive cell infiltration in colorectal cancer is an independent favorable prognostic factor. *PLoS One*. 2013; 8: e64814.
 22. Roncucci L., Mora E., Mariani F., Bursi S., Pezzi A., Rossi G., Pedroni M., Luppi D., Santoro L., Monni S. Myeloperoxidase-positive cell infiltration in colorectal carcinogenesis as indicator of colorectal cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2008; 17: 2291–2297.
 23. Rao H.L., Chen J.W., Li M., Xiao Y.B., Fu J., Zeng Y.X., Cai M.Y., Xie D. Increased intratumoral neutrophil in colorectal carcinomas correlates closely with malignant phenotype and predicts patients' adverse prognosis. *PLoS One*. 2012;7: e30806
 24. Gustafson M.P., Lin Y., Maas M.L., Van Keulen V.P., Johnston P.B., Peikert T., Gastineau D.A., Dietz A.B. A method for identification and analysis of non-overlapping myeloid immunophenotypes in humans. *PLoS One*. 2015; 10: e0121546.

Ответственный за переписку: Чудилова Галина Анатольевна, кандидат биологических наук, доцент. ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, 350063, Россия, г. Краснодар, ул. им. Митрофана Седина, 4. E-mail: chudilova2015@yandex.ru

Чудилова Г.А. SPIN: 2092–6412; ORCID: 0000–0001–8005–9325
 Нестерова И.В. SPIN: 4714–2488; ORCID: 0000–0002–5339–4504
 Ковалева С.В. SPIN: 8289–5342; ORCID: 0000–0002–9604–5806
 Ломтатидзе Л.В. SPIN: 2060–9316; ORCID: 0000–0002–7041–7106

Corresponding author: Chudilova G.A. – Associate Professor, PhD, Kuban State Medical University, 350063, Russia, Krasnodar, Mitrophana Sedina str., 4. E-mail: chudilova2015@yandex.ru

Chudilova G.A. ORCID: 0000–0001–8005–9325
 Nesterova I.V. ORCID: 0000–0002–5339–4504
 Kovaleva S.V. ORCID: 0000–0002–9604–5806
 Lomtadidze L.V. ORCID: 0000–0002–7041–7106